Die chemische Untersuchung einiger Gifte von Schlangen, Spinnen und Skorpionen.

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Hans B o h n

geboren in München

Würzburg 1956

Die chemische Untersuchung einiger Gifte von Schlangen, Spinnen und Skorpionen.

I N A U G U R A L - D I S S E R T A T I O N

zur Erlangung der Doktorwürde der

Hohen Naturwissenschaftlichen Fakultät der

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Hans B o h n

geboren in München

Würzburg 1956

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543517_0015

Berichterstatter: Professor Dr. F.G. F i s c h e r

Eingereicht am: 9.10.1956

Tag der mündlichen Prüfung: 12.12.1956

Die Arbeit wurde im Chemischen Institut
der Universität Würzburg unter der Leitung von
Prof. Dr. F.G. Fischer ausgeführt.

Inhaltsverzeichnis

ALLGEMEINER TEIL

Seite

I. Einleitung 1

II. Die Schlangen-Gifte 1

A. Die elektrophoretische Untersuchung der Schlangen-Gifte 2

B. Die säulenchromatographische Auftrennung des Giftes von Naja haje 4

C. Die Aminosäuren-Zusammensetzung der Giftsekrete und der aus ihnen abgetrennten Protein-Fraktionen 6

1. Die Ausführung der Analysen 6
2. Die Ergebnisse der Analysen und ihre Diskussion 11

III. Die Spinnen- und Skorpion-Gifte 13

A. Die papierelektrophoretische Auftrennung der Gifte 15

B. Die Aminosäuren-Zusammensetzung einiger Gifte 21

C. Nichtpeptidische basische Verbindungen im Gift der Vogelspinnen 24

1. Die UV-Absorption in Lösung 24
2. Das Verhalten bei der Elektrophorese 25
3. Die papierchromatographische Auftrennung 26
4. Nachweis und Identifizierung einiger Spaltprodukte 29

D. Die Diskussion der Ergebnisse 37

IV. Zusammenfassung 40

EXPERIMENTELLER TEIL

I. Zur Methodik der Elektrophorese 41

II. Zur Methodik der Säulenchromatographie 42

III. Ergänzungen und Verbesserungen zur papierchromatographischen Bestimmung der Aminosäuren 43

1. Die Bestimmung von Serin bei Gegenwart von Cystin 44
2. Nachweis und Bestimmung der γ-Aminobuttersäure 44
3. Die quantitative Bestimmung des Prolins mit Isatin 45
4. Die papierchromatographische Bestimmung des Histidins 46
5. Nachweis und Bestimmung von Histamin 48
6. Nachweis und Bestimmung der Aminozucker 48

IV. Eine Methode zur Mikrobestimmung von Ammonium-Ionen in Protein-Hydrolysaten 49

1. Die Abtrennung des Ammoniaks 53
2. Die Bestimmung des Ammoniaks 54
3. Empfindlichkeit und Genauigkeit der Methode 55

Literaturverzeichnis 57

ALLGEMEINER TEIL.

I. EINLEITUNG

Die Gifte der Schlangen und Spinnentiere besitzen zum großen Teil Eiweißnatur und stellen ein Gemisch mehr oder wenig toxisch wirkender Proteine dar. Außerdem sind vielfach noch andere organische, sowie auch anorganische Substanzen in ihnen enthalten.

Ziel der Untersuchung solcher Gifte ist, die einzelnen Komponenten zu trennen, ihre toxische Wirkung zu prüfen, und ihre Konstitution zu ermitteln.

Zur Auftrennung von Proteingemischen kann man sich der Elektrophorese bedienen, da die einzelnen Komponenten infolge verschiedener Molekülgröße, Ladung und Gestalt im allgemeinen verschiedene Beweglichkeiten im elektrischen Feld besitzen. Ein anderes, neuerdings immer mehr in den Vordergrund tretendes Verfahren zur Analyse von Proteingemischen ist die Säulenchromatographie. Bei ihr wird die Trennung der einzelnen Komponenten durch die verschieden starke Adsorption an Austauschersäulen erreicht.

Die auf diese Weise abgetrennten Proteinfraktionen lassen sich dann pharmakologisch testen oder chemisch untersuchen, indem man sie durch Hydrolyse bis zu den Aminosäuren abbaut und diese dann papierchromatographisch bestimmt.

II. DIE SCHLANGENGIFTE

Die Gifte von Schlangen sind bereits Gegenstand zahlreicher pharmakologischer und chemischer Untersuchungen gewesen. Nachdem man erkannt hatte, daß die Sekrete der Giftdrüsen zum großen Teil aus Eiweiß bestehen und ein Gemisch verschiedener Proteine darstellen, war man bemüht, die wirksamen Komponenten aus diesen Gemischen abzutrennen und rein zu erhalten. In zwei

Fällen ist es sogar gelungen hochwirksame Proteinbestandteile in kristalliner Form zu gewinnen. So konnte Slotta (1) aus dem Gift der Brasilianischen Klapperschlange Crotalus terrificus terrificus das "Crotoxin" in Form quadratischer Blättchen erhalten, während De (2) aus dem Gift der Brillenschlange Naja naja Hämolysin isolierte, das in feinen Nadeln kristallisiert.

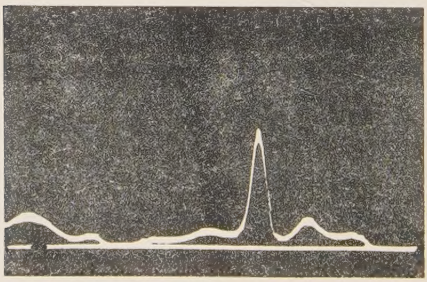
Zoologisch teilt man die Giftschlangen in die drei Familien der Elapidae, Viperidae und Crotalidae ein (3).
Die von mir untersuchten Schlangen Naja haje (Aegyptische Cobra) und Naja nigricollis (Schwarzhalscobra) gehören zur Familie der Elapidae, während Echis carinatus (Sandviper) einen Vertreter der Viperiden darstellt.

Die Gifte dieser Schlangen sind in Form von Trockenpräparaten aus der Schlangenfarm des Herrn Feruccio Trevisiol, Keren in Erythräa bezogen worden.

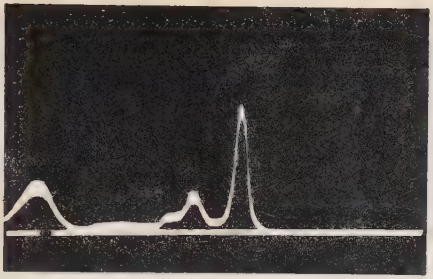
A. Die elektrophoretische Untersuchung der Schlangengifte.

Daß die Schlangengifte nicht einheitlich sind, geht mit aller Deutlichkeit aus elektrophoretischen Versuchen hervor. Infolge verschiedener Gestalt, Ladung und Größe der Moleküle besitzen die verschiedenen Komponenten unterschiedliche Beweglichkeiten und werden daher bei der Wanderung im elektrischen Feld voneinander getrennt. Da die Beweglichkeiten vom pH-Wert der Lösung abhängig sind, ist es notwendig, durch Versuche mit mehreren Puffern zunächst die optimalen Bedingungen für die Auftrennung ausfindig zu machen.

Nachfolgende Abbildungen zeigen die (zusammen mit W.P. Neumann) mit einer Tiseliusapparatur aufgenommenen Elektrophorosebilder der drei von mir untersuchten Gifte.

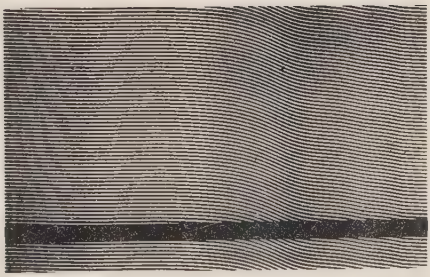


Elektrophoresebild des
Naja haje-Giftes
bei einem pH von 6,2



Elektrophoresebild des Naja nigricollis-Giftes bei einem pH von 6,2

+ ←O→ -



Elektrophoresebild des Echis carinatus-Giftes bei einem pH von 3,0 (Interferenzaufnahme)

+ ←O→ -

Die Sekrete der beiden Elapidae sind reich an basischen Proteinen und zeigen bei pH 6,2 eine Auftrennung in 10 (Naja haje) bzw. 8 (Naja nigricollis) elektrophoretisch verschiedene Fraktionen. Die Hauptmenge ihrer Proteine wandert zur Kathode. Dem Viperiden-Gift hingegen fehlen stark basische Komponenten und die Hauptmenge seiner Proteine bleibt bei einem pH von 6,8 am Start. Erst bei stärker saurem (pH 3,0) oder stärker alkalischem Medium (pH 9,0) erhält man eine maximale Auftrennung dieses Giftes in 5 Komponenten.

Mit der Elektrophoreseanordnung nach Tiselius lassen sich nicht nur die verschiedenen Komponenten der Giftsekrete erkennen, sondern es ist auch möglich, die am schnellsten wandernde Komponente präparativ in größeren Mengen zu gewinnen. Für eine solche elektrophoretische Abtrennung schien besonders die Hauptkomponente des Naja nigricollis-Giftes geeignet. Sie wurde mit Hilfe einer präparativen Elektrophoresezelle von den übrigen Proteinbestandteilen abgetrennt, mit Pikrinsäure aus der Lösung gefällt und das Pikrat mit salzsäurehaltigem Aceton zerlegt. Von diesem so in das Hydrochlorid übergeführten Protein wurde die Aminosäurenzusammensetzung ermittelt.

Das Gift von Naja haje wurde weiter säulenchromatographisch untersucht und aufgetrennt. Bei Echis carinatus wurde dagegen keine präparative Abtrennung von Proteinfraktionen vorgenommen, sondern nur die Aminosäurenzusammensetzung des Gesamtgiftes bestimmt.

B. Die säulenchromatographische Auftrennung des Giftes von Naja haje

Neben der Auftrennung der Proteingemische im elektrischen Feld hat sich neuerdings besonders die Trennung mit Ionenaustauschern bewährt. Für die säulenchromatographische Fraktionierung basischer Proteine mit niederem Molekulargewicht erwies sich das Harz IRC-50 (Amberlite XE-64) besonders geeignet. Paleus und Neilands (4) konnten an diesem Austauscher Cytochrom C, Moore und Stein (5) bzw. Stein und Tallan (6) Ribonuklease sowie Lysozym auftrennen und reinigen.

Da die Gifte der Schlangen, besonders die Elapidengifte, ebenfalls basenreiche niedermolekulare Proteine enthalten, lag es nahe das Verhalten dieser Eiweißgemische an solchen Austauschersäulen zu studieren.

Bei dem untersuchten Gift von Naja haje zeigte sich, daß tatsächlich ein großer Teil (60%) des Giftes bei geeignetem pH durch die Säule hindurchwandert und sich in mehrere Komponenten zerlegen läßt. Denn ähnlich wie bei der Elektrophorese ist die durch Austausch bzw. Adsorption in diesen Säulen erhaltene Auftrennung vom pH-Wert abhängig. Zur Eluierung werden daher Pufferlösungen verwendet, und auch die zum Füllen der Säulen benützten Austauscher müssen vor dem Gebrauch auf den entsprechenden pH-Wert eingestellt werden.

Die zu untersuchende Substanz wird dann in möglichst wenig Puffer gelöst am oberen Ende der Säule eingebracht, und mit Pufferlösung durch die Säule hindurchgespült. Infolge verschieden starker Adsorption bzw. verschieden starken Austausches erfolgt dabei eine Auftrennung in die einzelnen Komponenten. Die am Ende der Säule austretende Flüssigkeit wird fraktioniert gesammelt, und die einzelnen Fraktionen werden mit Ninhydrin auf ihren Protein-Gehalt untersucht. Trägt man die bei der Farbreak-

tion mit Ninhydrin erhaltenen Extinktionen in Abhängigkeit des Ausflußvolumens auf, so erhält man Kurven, aus welchen sich , ähnlich wie bei den Elektrophoresebildern nach Philpot-Svensson. die Zahl der Fraktionen anschaulich entnehmen läßt. Allerdings stellen hier die von der Kurve mit der Grundlinie eingeschlossenen Flächen kein absolutes Maß für die Mengenverhältnisse der einzelnen Komponenten dar, da die verschiedenen Proteine je nach Gehalt an freien basischen Gruppen, sehr verschieden stark mit Ninhydrin zu reagieren vermögen.

Die Auftrennung des Naja haje-Giftes wurde zunächst bei pH 7,18, bei welchem Tallan und Stein eine optimale Auftrennung des Lysozyms erhalten haben, studiert. Das Ergebnis dieses analytischen Versuches (Einwaage 7 mgr Rohgift, Säule 1 x 35 cm) ist in Abb. 1a auf Tafel I wiedergegeben. In einem präparativen Ansatz (Einwaage 300 mgr, Säule 3 x 55 cm) bei demselben pH wurden zunächst die beiden Hauptfraktionen (Fraktion I und II) getrennt, die Proteine als Pikrate aus ihrer Lösung gefällt, und mit salzsäurehaltigem Aceton in die Hydrochloride verwandelt. (Abb. 1b).

Die Ausbeuten waren: Fraktion I 60,5 mgr
Fraktion II 70,0 mgr

Die unmittelbar hinter Fraktion II im Ausfluß erscheinenden kleineren Fraktionen (Abb. 1a und 1b) wurden gemeinsam gefällt und ergaben 8,5 mgr Proteinhydrochlorid. Es waren also etwa 50-60 % des Giftes durch die Säule hindurchgewandert, während der Rest im Austauscher zurückgehalten wird.

Fraktion I und II wurden nun zur Prüfung auf ihre Einheitlichkeit noch bei anderen pH-Werten untersucht. Dabei zeigte sich, daß schon bei geringer Erniedrigung des pH-Wertes bei beiden Fraktionen eine Auftrennung in weitere Komponenten stattfindet. Bei Fraktion I genügte bereits die Erniedrigung um 0,18 pH-Einheiten für die präparative Abtrennung der Hauptkomponente Ia (Abb. 2a und 2b). Bei Fraktion II war es dagegen notwendig, den pH-Wert bis auf 6,90 zu senken, um seine beiden Hauptkomponenten IIa und IIb für eine präparative Trennung weit genug voneinander zu trennen (Abb. 3a und 4a)

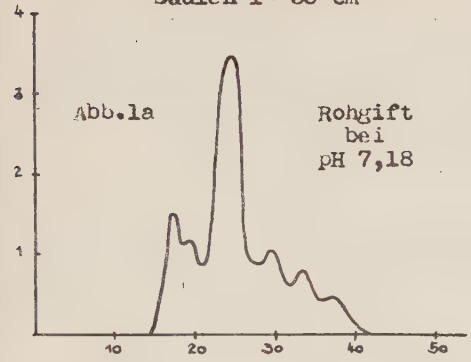
Die Ausbeuten waren: Fraktion Ia 20 mgr
" IIa 18 "
" IIb 20 "

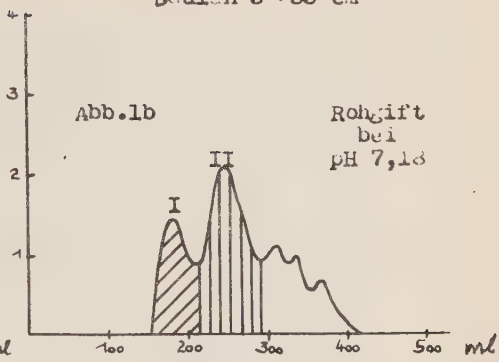
Analytische Trennungen

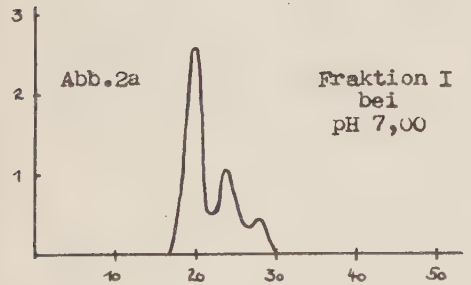
Säulen 1 × 35 cm

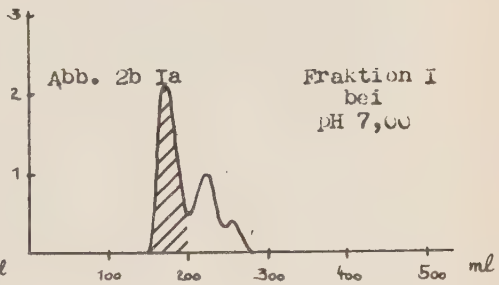
Präparative Trennungen

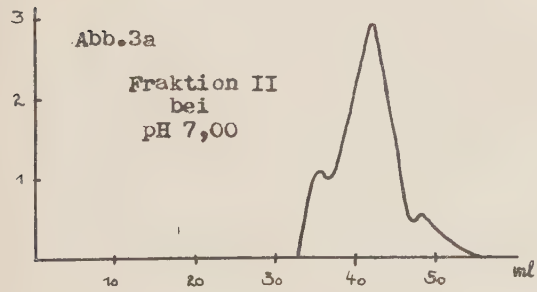
Säulen 3 × 55 cm



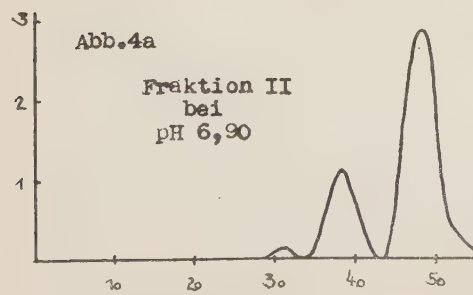


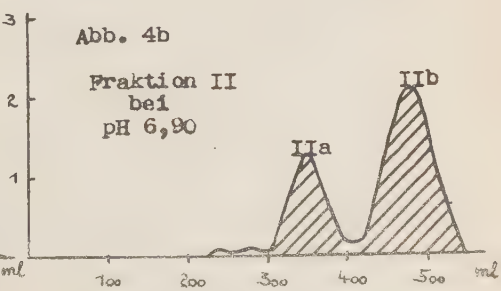






Die säulenchromatographische Auftrennung des Giftes von Naja haje





Von diesen säulenchromatographisch einheitlichen Fraktionen wurden die Aminosäuren quantitativ papierchromatographisch bestimmt. Die Ergebnisse dieser Analysen werden im nachfolgenden Abschnitt mitgeteilt. Dort wird auch die Frage der chemischen Einheitlichkeit dieser Proteine diskutiert.

C. Die Aminosäuren-Zusammensetzung der Giftsekrete und der aus ihnen abgetrennten Protein-Fraktionen

Sowohl die Gesamtgifte der drei untersuchten Schlangen, als auch die aus ihnen elektrophoretisch bzw. säulenchromatographisch abgetrennten Proteinfraktionen wurden einer [illegible] Analyse unterworfen, um festzustellen, welche Aminosäuren an ihrem Bau beteiligt sind, und in welchem Mengenverhältnis diese vorliegen.

1. Die Ausführung der Analyse.

Die Substanzen wurden bei 60° im Vacuum über Phosphorpentoxyd bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, eingewogen, und mit einem Gemisch aus gleichen Teilen Ameisensäure und 20%iger Salzsäure 24 Stunden bei 100° hydrolysiert.

Die Bestimmung der Aminosäuren im Hydrolysat erfolgte papierchromatographisch nach einer von F.G. Fischer und H.Dörfel ausgearbeiteten Methode (7). Diese verwendet die von Mc.Farren (8) angegebenen gepufferten Verteilungsmedien, wertet aber die Ninhydrinfärbungen nicht direkt nach der maximum density-Methode aus, sondern bestimmt die Extinktionen der in Lösung gebrachten Kupferkomplexe dieser Ninhydrinfärbungen, und ermöglicht durch die Anwendung von weitgehend an die Analysenlösung angeglichenen Vergleichslösungen eine sehr genaue Bestimmung der [illegible]säuren. Die Genauigkeit dieser Methode beträgt bei einer Einwaage von 5-10 mgr Protein je nach Aminosäure 1-4 %.

Ueber einige von mir gemachten Ergänzungen bzw. Verbesserungen des Verfahrens in Bezug auf die Bestimmung von Histidin, Prolin, Serin und Glukosamin wird im experimentellen Teil berichtet. Das Tryptophan wurde UV-spektroskopisch nach der Methode von Goodwin und Morton (9) bestimmt, während der HCl-Gehalt der als Hydrochlorid abgetrennten Proteinfraktionen

potentiometrisch durch Titration mit Silbernitrat ermittelt wurde.

2. Die Ergebnisse der Analysen und ihre Diskussion.

In Tabelle I sind die Ergebnisse der Analysen der Gesamtgifte (Rohgifte), in Tabelle II dagegen die der elektrophoretisch und säulenchromatographisch abgetrennten Proteinfraktionen wiedergegeben. Die Zahlen beziehen sich auf die bei 60° im Vacuum getrockneten Substanzen und stellen die in Prozenten ausgedrückten Gewichtsanteile der einzelnen Aminosäuren dar.

Die Gifte wurden in den Tabellen mit den beiden Anfangsbuchstaben ihrer lateinischen Namen abgekürzt und außerdem durch ein R (= Rohgift), Sp (= elektrophoretische Spitzenfraktion) bzw. bei den säulenchromatographischen Fraktionen durch Bezifferung näher gekennzeichnet.

a) Die Aminosäuren-Zusammensetzung der Rohgifte:

Wie aus Tabelle I ersichtlich, waren alle 18 Aminosäuren, die auch sonst in Proteinen gewöhnlich vorkommen, in den Giftsekreten der drei Schlangen enthalten.

Zieht man von der Summe der Aminosäuren die bei der Hydrolyse aufgenommene und aus der Molzahl berechenbare Wassermenge ab, so erhält man den Proteingehalt der Gifte. Dieser liegt bei allen drei Rohgiften in gleicher Größenordnung und beträgt 80 - 83 %. Der Rest besteht zum Teil aus anorganischen Salzen (nach vorsichtigem Veraschen mit Salpeter- und Schwefelsäure wurde beim Naja haje-Gift ein Rückstand von 4,38 %, beim Naja nigricollis-Gift ein solcher von 7,8 % festgestellt) und enthält wahrscheinlich noch andere jedenfalls nichtstickstoffhaltige Verbindungen (z.B. Lipoide), denn aller bei der Elementaranalyse bestimmter Stickstoff war in Form von Aminosäuren wiedergefunden worden.

Die Giftsekrete von Naja haje und Naja nigricollis zeigen eine weitgehende Uebereinstimmung in ihrer Aminosäuren-Zusammensetzung und weisen ähnlich wie das Gift der Honigbiene (10) einen hohen Gehalt an basischen Aminosäuren auf.

Tabelle I

Die Aminosäuren-Zusammensetzung der Rohgifte.

Aminosäure	gr Aminosäure in 100 gr Rohgift		
	ECR	NHR	NNR
Cystin	6,57	10,46	8,92
Tyrosin	6,16	5,54	4,92
Valin	3,52	6,13	3,90
Methionin	2,57	3,85	4,43
Asparaginsäure	13,30	10,72	9,76
Glutaminsäure	9,95	5,71	4,92
Serin	3,29	2,62	3,23
Glykokoll	4,62	2,92	2,90
Threonin	4,21	5,49	4,79
Alanin	3,57	2,62	2,79
Lysin	6,71	11,31	11,17
Arginin	5,52	4,82	6,30
Phenylalanin	3,92	2,93	2,64
Isoleucin	3,36	3,05	3,50
Leucin	4,97	5,47	6,32
Prolin	3,84	7,42	8,42
Histidin	3,29	1,93	1,26
Tryptophan	3,02	2,66	2,71
Glucosamin	1,45	-	-
Summe	93,84	95,65	92,88
Die bei der Hydrolyse aufgenommene Wassermenge in gr	-12,22	-12,38	-12,12
Proteingehalt	81,62 %	83,27 %	80,76 %
N berechnet aus den Analysenergebnissen	12,77 %	13,03 %	12,94 %
Stickstoffwert der Elementaranalyse	12,98 %	13,01 %	12,93 %

Tabelle II

Die Aminosäuren-Zusammensetzung der Proteinfraktionen.

Aminosäure	gr Aminosäure in 100 gr Proteinhydrochlorid			
	NN Sp	NH Ia	NH IIa	NH IIb
Cystin	10,72	11,12	10,30	10,10
Tyrosin	5,16	3,87	5,82	6,04
Valin	4,91	4,64	6,96	9,15
Methionin	7,42	2,11	7,00	4,00
Asparaginsäure	10,54	14,14	10,78	11,23
Glutaminsäure	2,76	6,97	4,30	3,98
Serin	3,21	4,28	1,63	4,73
Glykokoll	2,47	4,67	2,26	2,36
Threonin	4,77	8,97	4,52	4,14
Alanin	2,55	3,14	2,38	1,42
Lysin	15,98	5,89	14,42	14,59
Arginin	6,38	8,67	2,84	2,52
Phenylalanin	2,51	5,31	2,88	3,07
Isoleucin	4,31	3,65	2,98	1,47
Leucin	7,63	2,34	6,18	6,74
Prolin	13,63	8,32	10,04	8,40
Histidin	(< 0,5)	1,01	2,38	2,32
Tryptophan	2,50	2,55	3,03	3,28
Summe	107,45	101,64	100,70	99,54
Die bei der Hydrolyse aufgenommene Wassermenge in gr	-14,80	-14,28	-13,70	-13,68
Proteingehalt	92,65 %	87,36 %	87,00 %	85,86 %
HCl-Gehalt	+8,78 %	+6,19 %	+9,40 %	+7,84 %
Summe	101,43 %	93,55 %	96,40 %	93,70 %

Tabelle III

Die Molverhältnisse der Aminosäuren in den Fraktionen des Naja haje-Giftes an den Stellen geringster prozentualer Abweichung von der Ganzzahligkeit.

	NH Ia	NH IIa	NH IIb
Molzahl bei einem Protein-hydrochlorid-Gewicht von	14 800	13 200	12 000
Cystin/2	13,70	11,30	10,07
Tyrosin	3,16	4,23	4,01
Valin	5,86	7,84	9,37
Methionin	2,08	6,19	3,21
Asparaginsäure	15,71	10,70	10,12
Glutaminsäure	7,01	3,86	3,24
Serin	6,02	2,04	5,40
Glykokoll	9,21	3,97	3,78
Threonin	11,15	5,02	4,17
Alanin	5,21	3,52	1,91
Lysin	5,96	13,01	12,00
Arginin	7,36	2,15	1,73
Phenylalanin	4,75	2,29	2,23
Isoleucin	4,11	2,99	1,34
Leucin	2,63	6,21	6,16
Prolin	10,70	11,51	8,76
Histidin	0,96	2,02	1,79
Tryptophan	1,85	1,95	1,92
Mittlere prozentuale Abweichung von der Ganzzahligkeit	3,56 %	3,80 %	6,79 %

Bei Echis carinatus hingegen überwiegen die sauren Aminosäuren, was auch beim elektrophoretischen Verhalten dieses Giftes deutlich zum Ausdruck kam. Weiterhin unterscheidet sich dieses Viperidengift von den beiden anderen Giften durch seinen Gehalt an Glucosamin. Dieser Aminozucker war zunächst als unbekannter ninhydrin-positiver Fleck im Phenol(pH=1)-Chromatogramm zwischen Cystin und Asparaginsäure aufgetaucht, konnte aber als Glukosamin erkannt und unter Verwendung einer glucosaminhaltigen Vergleichslösung quantitativ bestimmt werden.

b) Die Aminosäuren-Zusammensetzung der Proteinfraktionen:

Die Ergebnisse der Aminosäuren-Analyse der elektrophoretisch bzw. säulenchromatographisch abgetrennten Fraktionen sind in Tabelle II zusammengestellt. Auch hier waren alle 18 in den Rohgiften gefundenen Aminosäuren wieder enthalten. In ihrer quantitativen Zusammensetzung weichen sie dagegen in mancher Hinsicht von den Gesamtgiften ab.

Bei der elektrophoretisch abgetrennten Fraktion des Naja nigricollis-Giftes beträgt die Summe aus Protein- und Salzsäuregehalt 101,4 %. Durch die Aminosäuren-Analyse waren also alle Bestandteile dieser Fraktion erfaßt worden. Bei den säulenchromatographisch abgetrennten Fraktionen des Naja-haje-Giftes erhält man als Summe von Protein und Salzsäure dagegen nur 93-96 %. Ursache für die fehlenden 4-7 % dürfte hier der bei der Hydrolyse aller drei Fraktionen in Form von farblosen Flocken ungelöst zurückgebliebene Anteil sein. Wahrscheinlich handelt es sich aber hierbei nicht um einen Bestandteil der Proteine selbst, sondern um Beimengungen, die vielleicht aus dem Austauscherharz der Säule stammen und von den Proteinen mitgenommen wurden.

Vergleicht man die Aminosäuren-Zusammensetzung der elektrophoretisch abgetrennten Fraktion mit den Ergebnissen der Analyse des Naja nigricollis-Rohgiftes, aus dem sie abgetrennt wurde, so zeigt sich, daß Lysin, Prolin, Methionin und Cystin eine Anreicherung, Histidin und Glutaminsäure dagegen eine Verarmung in dieser Fraktion erfahren haben, während die Anteile der übrigen Aminosäuren nicht wesentlich verändert wurden. Besonders erstaunlich ist der hohe Prolingehalt dieses Proteins.

Bei den säulenchromatographisch abgetrennten Komponenten des Naja haje-Giftes zeigen Fraktion IIa und IIb weitgehende Uebereinstimmung in Bezug auf ihre Aminosäuren-Zusammensetzung. Nur die Methionin-, Serin-, Alanin- und Isoleucinwerte weisen größere Abweichungen auf. Von der Zusammensetzung des Rohgiftes unterscheiden sie sich besonders durch den höheren Lysin- und durch den geringeren Arginin-Gehalt. Wesentlich anders aufgebaut ist dagegen Fraktion Ia. Auffallend ist hier besonders das Ueberwiegen der sauren Aminosäuren über die basischen, und der hohe Gehalt an Threonin.

An Hand der Aminosäuren-Zusammensetzung läßt sich eine gewisse Aussage über die chemische Einheitlichkeit der Proteine machen. Trägt man die Molzahlen der Aminosäuren in Abhängigkeit vom Proteinhydrochlorid-Gewicht auf, dann müssen, wenn sich die Fraktion aus einheitlichen Molekülen aufbaut, bei dem Abszissenwert, der dem Molekulargewicht entspricht alle Aminosäuren einen ganzzahligen oder angenähert ganzzahligen Ordinatenwert besitzen. Die Summe der prozentualen Abweichung von der Ganzzahligkeit muß also bei einheitlichen Proteinen an dieser Stelle 0 sein, oder zumindest ein ausgeprägtes Minimum aufweisen.

Für die elektrophoretisch abgetrennte Fraktion des Naja nigricollis-Giftes war von W.P. Neumann durch Diffusionsmessungen ein Molekulargewicht von 12000 ermittelt worden. Doch war aus der graphischen Darstellung in diesem Bereich der Abszisse auch kein angenähert ganzzahliges Verhältnis für alle Aminosäuren zu entnehmen. Gegen die chemische Einheitlichkeit dieser Fraktion spricht auch der geringe Gehalt an Histidin, das erst bei einem Molekulargewicht von über 20 000 mit einem Mol vertreten wäre.

Die säulenchromatographisch abgetrennten Fraktionen des Naja haje-Giftes lassen dagegen eine gewisse chemische Einheitlichkeit erkennen. Fraktion Ia besitzt bei einem Molekulargewicht von 14 800, Fraktion IIa bei 13 200 ein weitgehend an die Ganzzahligkeit angenähertes Molverhältnis der meisten Aminosäuren. Die mittlere prozentuale Abweichung von der Ganzzahligkeit beträgt an dieser Stelle bei Fraktion Ia 3,56 % bei Fraktion IIa 3,80 %. Weniger einheitlich scheint Fraktion IIb zu sein, die zwei etwa gleich große, weniger scharf ausgeprägte Minima bei 12 000 und 14 000 aufweist.

In Tabelle III sind die Molzahlen der Aminosäuren der säulenchromatographisch abgetrennten Fraktionen wiedergegeben, berechnet für die jeweiligen Proteinhydrochlorid-Gewichte, bei denen die Summe der prozentualen Abweichung von der Ganzzahligkeit ein Minimum beträgt.

III. DIE SPINNEN- UND SKORPION-GIFTE

Unter den Spinnentieren (Arachnida) besitzen sowohl die Skorpione (Scorpiones), als auch die Vertreter der echten Spinnen (Araneae) einen Giftapparat, welchen sie zum Fangen ihrer Nahrung und zur Verteidigung verwenden. Bei den Skorpionen befinden sich die Giftdrüsen im letzten, mit einem Stachel versehenen Segment des Hinterleibes, bei den Spinnen dagegen vorne am Kopf in Verbindung mit den Cheliceren (Kieferklauen).

Die physiologischen Wirkungen dieser toxischen Sekrete sind bereits Gegenstand zahlreicher Untersuchungen gewesen. Besonders eingehend und zusammenfassend ist darüber von Vellard (11) in seinem Buch "Le venin des araignées" berichtet worden. Die chemische Natur der Spinnentier-Gifte aber war bisher noch kaum erforscht.

Ueber einige physikalische und chemische Daten eines Skorpiongiftes (Centruroides noxius) wurde zum ersten Mal von Rosendo Ramirez (12) berichtet. Als Bestandteile des Sekretes konnten Protein, Fett, Schwefel und Chlor nachgewiesen werden, während die Reaktion auf Zucker negativ war (12).

Zwei japanischen Forschern, Temmin Kaku und Ichiro Kaku, gelang es, aus dem Gift des Skorpions Buthus Martensii nach dem Abtrennen der Proteine mit basischem Bleiacetat, aus dem Filtrat eine wirksame Komponente mit Pikrinsäure zu fällen und in das Hydrochlorid zu verwandeln. In Analogie zu dem aus Schlangengift (Crotalus terrificus terrificus) abgetrennten "Crotoxin" wurde diese aus Buthus isolierte toxische Komponente als "Buthoxin" bezeichnet (13).

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, daß die Skorpion-Gifte mit den Giften der Schlangen chemisch verwandt sind, und

daß wie bei diesen, Proteine oder eiweißähnliche Bestandteile als Träger der Giftwirkung zu betrachten sind.

In neuester Zeit waren die Gifte von zwei Skorpionen (Centruroides elegans und Centruroides suffusus) auch Gegenstand elektrophoretischer Untersuchungen, mit dem Ziel, die einzelnen Komponenten voneinander zu trennen und die toxisch wirkenden Fraktionen zu ermitteln (14).

Noch weniger als die Gifte der Skorpione sind in chemischer Hinsicht die Sekrete der echten Spinnen erforscht. Vellard, der besonders die Gifte der südamerikanischen Spinnen untersucht hat, kam zu der Feststellung, daß auch sie eiweißhaltige, den Schlangengiften nahestehende komplexe Systeme darstellen. Eine nähere Untersuchung der Proteine und übrigen Bestandteile der Spinnengifte war aber bisher nicht erfolgt.

In der vorliegenden Arbeit soll nun über die mit neueren Methoden durchgeführte chemische Untersuchung einiger Spinnentier-Gifte berichtet werden. Bearbeitet wurden die Sekrete von zwei Skorpionen und elf Spinnen. Die Gifte dieser Tiere waren in Form von Trockenpräparaten von W. Bücherl aus Sao Paolo bezogen worden.

Bei den von mir untersuchten echten Spinnen handelt es sich zum größten Teil um Vertreter aus der Gruppe der Vogelspinnen, die zu den größten Spinnen der Welt gehören und eine Körperlänge von 10 cm erreichen können. Das Gift dieser Tiere ruft aber beim Menschen meist nur lähmende Wirkung hervor. Gefährlicher dagegen ist die zu den Wolfsspinnen gehörende Tarantel Lycosa erythrognatha, deren Biss große Hautwunden erzeugt. Zu den giftigsten Spinnentieren Brasiliens gehören Phoneutria fera aus der Familie der Ctenidae und die beiden Skorpione Tityus serrulatus und Tityus bahiensis. Ihr Gift kann sehr gefährlich wirken und auch für den Menschen tödliche Folgen haben.

Es folgt nun eine Uebersicht über die Spinnentiere, deren Giftsekrete untersucht wurden, und ihre systematische Zugehörigkeit.

Ordnung: Araneae, Spinnen

Gattung	Art	Familie	Subordo
Pamphobeteus	tetracanthus	Aviculariidae	Orthognatha
"	sorocabae	"	"
"	roseus	"	"
Grammostola	actaeon	"	"
"	mollicoma	"	"
"	pulchripes	"	"
Lasiodora	klugii	"	"
Eurypelma	vellutinum	"	"
Acanthoscurria	atrox	"	"
Phoneutria	fera	Ctenidae	Labidognatha
Lycosa	erythrognatha	Lycosidae	"

Ordnung: Scorpiones

Tityus serrulatus	gelber Skorpion
Tityus bahiensis	schwarzer Skorpion

Die Gifte dieser Spinnentiere wurden zunächst papierelektrophoretisch untersucht und aufgetrennt. Die dabei gemachte Beobachtung über das Vorhandensein von freien Aminosäuren in diesen Sekreten führte dann zum papierchromatographischen Nachweis und zur quantitativen Bestimmung dieser Komponenten. Von einigen Giften wurde auch die Gesamtanalyse der Aminosäuren im Hydrolysat ausgeführt.

A. Die papierelektrophoretische Auftrennung der Gifte.

Infolge der geringen zur Verfügung stehenden Substanzmengen wurde bei den Spinnentier-Giften nicht die Methode der freien Elektrophorese nach Tiselius wie bei den Schlangengiften, sondern das Verfahren der Papierelektrophorese zur Auftrennung verwendet. Die zu untersuchende Substanz (es genügen bereits 0,5 - 1 mgr) wird dabei auf mit Puffer getränkte Papierstreifen aufgetragen und der Wirkung eines elektrischen Feldes ausgesetzt. Das Sichtbarmachen der einzelnen Komponenten auf dem Papier nach der Auf-

trennung erfolgt dann mit geeigneten Farbreaktionen und Färbemethoden. Mit Ninhydrin lassen sich Aminosäuren, Peptide, und in geringerem Maße auch Proteine sichtbar machen, während Amidoschwarz im allgemeinen nur mit Proteinen reagiert.

Die Ausführung der Elektrophorese erfolgte nach der Methode von Grassmann und Hannig (15) mit Hilfe eines Elphor-H Gerätes. Als Elektrolytflüssigkeit wurden Veronalpufferlösungen nach E. Wiedemann (16) verwendet. Weitere Einzelheiten zur Methodik sind im experimentellen Teil dieser Arbeit beschrieben.

Zunächst war es notwendig, unter Verwendung von verschiedenen pH-Werten und verschiedenen Versuchszeiten die optimalen Bedingungen für die Auftrennung ausfindig zu machen. Die besten Ergebnisse wurden erzielt bei einem pH von 7,0 und einer Versuchsdauer von 4 Stunden bei einer Spannung von 110 Volt.

Es wurden jeweils 2 Papierstreifen mit Puffer getränkt, und in die Elektrophorese-Kammer eingespannt. Das Auftragen der Substanz erfolgte in der Mitte, um sowohl die anodisch, als auch die kathodisch wandernden Bestandteile zu erfassen. Nach der Auftrennung im elektrischen Feld unter den oben angeführten Bedingungen wurde ein Streifen mit Ninhydrin, der andere mit Amidoschwarz 10 B angefärbt. Die Auswertung der mit Paraffin transparent gemachten Streifen erfolgte mit monochromatischem Licht unter Verwendung eines Beckman-Photometers. Die Amidoschwarz-Färbungen wurden bei 620 m μ, die in die Kupferkomplexe übergeführten Ninhydrin-Färbungen bei 515 m μ photometriert. In Abb. 1a - 13a sind die mit Ninhydrin, in Abb. 1b - 13b, die mit Amidoschwarz auf diese Weise erhaltenen Elektrophoresebilder wiedergegeben. Der in der graphischen Darstellung mit 0 bezeichnete Abszissenwert stellt den Ausgangspunkt der auf das Papier aufgetragenen Giftsubstanz dar. Die Abstände von dieser Startlinie wurden in Richtung zur Kathode mit minus (-), in Richtung zur Anode mit plus (+) bezeichnet. Die an den jeweiligen Stellen gemessenen Extinktionen sind als Ordinaten wiedergegeben.

Ein Vergleich der mit Ninhydrin und mit Amidoschwarz angefärbten Elektrophoresestreifen zeigte, daß in allen Spinnentier-Sekreten ninhydrin-positive, sich mit Amidoschwarz hingegen nicht färbende, Komponenten enthalten sind. Wie die papierchromatographische Untersuchung ergab, handelt es sich dabei um freie

Aminosäuren, die in den untersuchten Giften oft mit einem beträchtlichen Anteil enthalten sind. Folgende Aminosäuren konnten in freier Form nachgewiesen werden: Glutaminsäure, γ-Aminobuttersäure, Asparaginsäure und Lysin. In zwei Giften wurde auch Histamin als Bestandteil aufgefunden.

Die γ-Aminobuttersäure war bei der papierchromatographischen Untersuchung der Gifte zunächst als unbekannter Fleck im Phenol-(pH 1)-Chromatogramm mit einem R_f-Wert von 0,5 aufgetreten, konnte aber schließlich durch zahlreiche vergleichende papierchromatographische Untersuchungen als solche erkannt und identifiziert werden. Bei der Elektrophorese bei pH 7,0 wandert die γ-Aminobuttersäure nur sehr langsam kathodisch und befindet sich nach der von mir gewählten Versuchszeit von 4 Stunden noch in unmittelbarer Nähe der Startlinie. Glutaminsäure und Asparaginsäure hingegen wandern rasch anodisch, während sich die beiden basischen Komponenten Lysin und Histamin zur Kathode bewegen. Histamin wandert dabei schneller als Lysin, während Asparaginsäure und Glutaminsäure beide die gleiche Geschwindigkeit haben und bei der Elektrophorese nicht getrennt werden. Zur besseren Orientierung sind die Ninhydrin-Färbungen dieser in den Giften frei vorkommenden Aminosäuren in den Elektrophorese-Bildern auf Tafel II-V schraffiert wiedergegeben. (Siehe Tafel III)

Da jeweils mehrere Gifte in ihrem elektrophoretischen Verhalten und in ihrem Gehalt an freien Aminosäuren Uebereinstimmungen zeigen, lassen sich die untersuchten Spinnentier-Gifte auf Grund ihrer chemischen Zusammensetzung in verschiedene Gruppen zusammenfassen. Die Sekrete der beiden Skorpione, die an freien Aminosäuren nur Lysin enthalten, stehen getrennt für sich, während die wesentlich anders zusammengesetzten Gifte der echten Spinnen sich in 3 Typen aufgliedern lassen.

Es folgt nun eine Beschreibung der einzelnen Gruppen und ihrer Vertreter, mit Angaben der in diesen Giften jeweils enthaltenen freien Aminosäuren, soweit sie quantitativ bestimmt wurden.

Gruppe I der Spinnentier - Gifte.

Diese Gruppe umfaßt den größeren Teil der untersuchten Spinnen, und zwar handelt es sich dabei ausschließlich um Vertreter der Familie der Avicullariidae. Hierher gehören:

Pamphobeteus	roseus
Pamphobeteus	sorocabae
Grammostola	pulchripes
Lasiodora	klugii
Eurypelma	vellutinum
Pamphobeteus	tetracanthus
Acanthoscurria	atrox

Die Elektrophorese-Bilder dieser Gifte sind auf Tafel II und Tafel III wiedergegeben. Charakteristisch für diese Gruppe ist die rasch kathodisch wandernde Hauptkomponente, die nach 4 Stunden unter den gewählten Elektrophorosebedingungen bereits 3,5-4 cm in Richtung zur Kathode zurückgelegt hat, und sowohl mit Ninhydrin als auch mit Amidoschwarz positiv reagiert. Wie nähere Untersuchungen ergaben, handelt es sich dabei aber nicht um ein Protein, sondern um mehrere, mit gleicher Geschwindigkeit wandernde basische Komponenten, die bisher noch nicht restlos aufgeklärt werden konnten. Diese basischen Verbindungen zeigen nach dem Besprühen mit methanolischer Natronlauge auf dem Papier eine intensiv leuchtend blaue Fluoreszenz, die auch bei der papierchromatographischen Untersuchung und Auftrennung zu ihrem Nachweis Verwendung fand. Besonders charakteristisch aber für diese Komponenten, und damit auch für die Gifte dieser Spinnentier-Gruppe, ist die überaus starke UV-Absorption in alkalischer Lösung, mit Maxima bei 330 m μ und 240 m μ. Daher sollen im folgenden diese basischen Bestandteile kurz als UV-Komponenten bezeichnet werden. Ueber weitere Eigenschaften und Reaktionen dieser Substanzen wird in einem späteren Abschnitt berichtet.

Unmittelbar anschließend an die UV-Komponenten folgt dann bei den meisten Giften dieser Gruppe im Elektrophorese-Bild eine basische Proteinkomponente. Die übrigen Eiweißfraktionen wandern nur sehr langsam kathodisch bzw. anodisch und bleiben in unmittelbarer Nähe des Startes zurück.

An freien Aminosäuren enthalten die Gifte dieser Gruppe γ-Aminobuttersäure und Glutaminsäure. Die γ-Aminobuttersäure ist in allen diesen Sekreten reichlich vertreten, während der Gehalt an Glutaminsäure meist unter 1 % liegt. Nur Acanthoscurria atrox besitzt wesentlich mehr Glutaminsäure und enthält zum Unterschied von den übrigen Giften der Gruppe I auch etwas freie Asparaginsäure.

Der Gehalt an freien Aminosäuren läßt sich größenordnungsmäßig leicht aus den mit Ninhydrin erhaltenen Elektrophorese-Bildern entnehmen. Die an vier Giften dieser Gruppe durchgeführte quantitative papierchromatographische Bestimmung der freien Aminosäuren, mit Phenol(pH 12) als Verteilungsmedium, zeigte folgende Ergebnisse:

		γ-Aminobuttersäure	Glutaminsäure	Asparaginsäure
Pamphobeteus	sorocabae	5,2 %	0,5 %	0
Lasiodora	klugii	7,1 %	0,7 %	0
Pamphobeteus	tetracanthus	5,7 %	1,5 %	0
Acanthoscurria	atrox	3,6 %	7,1 %	< 0,5%

Gruppe II der Spinnentier-Gifte

Zu den Vertretern dieser Gruppe gehören zwei Vogelspinnen der Gattung Grammostola,

Grammostola mollicoma
Grammostola actaeon

Die Elektrophorese-Bilder dieser Gifte sind auf Tafel IV zu finden. Die UV-Komponenten sind in den Sekreten dieser beiden Vogelspinnen nur in sehr geringen Mengen enthalten. Auffallend ist hier der hohe Gehalt an freier Glutaminsäure, während die γ-Aminobuttersäure etwas schwächer als bei den Giften der Gruppe I vertreten ist. Die quantitative papierchromatographische Bestimmung dieser Aminosäuren, mit Phenol (pH 1) als Verteilungsmedium, ergab folgende Ergebnisse:

		γ-Aminobuttersäure	Glutaminsäure
Grammostola	mollicoma	3,9 %	21,8 %
Grammostola	actaeon	1,5 %	18,5 %

Die Hauptmenge der Proteine in diesen Sekreten ist basisch und wandert zur Kathode, nur einige kleinere Komponenten bleiben in der Nähe des Startes zurück (Abb. 8b und 9b). Bei stärker saurem pH, und bei längerer Versuchsdauer lassen die bei pH 7,0 einheitlich kathodisch wandernden Protein-Hauptfraktionen dieser Gifte eine weitere Auftrennung in zwei Komponenten erkennen.

Die Gruppe III der Spinnentier-Gifte.

Diese Gruppe umfaßt die beiden gefährlichen, zur Unterordnung der Labidognatha gehörenden, Spinnen

Phoneutria fera
Lycosa erythrognatha

Besonders charakteristisch für die Gifte dieser beiden Tiere ist der Gehalt an Histamin. Außerdem besitzen sie wie die Gifte der Gruppe II reichlich freie Glutaminsäure, während im Gegensatz zu den Giften der Gruppe I und II die γ-Aminobuttersäure hier vollständig fehlt. In geringer Menge sind in diesen Sekreten dann noch Asparaginsäure und Lysin in freier Form enthalten. Bei der quantitativen Bestimmung des Histamins und der freien Aminosäuren in diesen Giften wurden folgende Ergebnisse erzielt:

	Histamin	Lysin	Glutaminsäure	Asparaginsäure
Phoneutria fera	1,0 %	0,2 %	23,6 %	1,0 %
Lycosa erythrognatha	3,6 %	1,0 %	11,8 %	0,7 %

Wie bereits aus den Elektrophorese-Bildern dieser Gifte (Abb. 10a und 11a auf Tafel IV) zu entnehmen war, enthält Phoneutria fera wesentlich mehr Glutaminsäure, dafür aber weniger Lysin und Histamin als Lycosa erythrognatha. Der Nachweis und die Identifizierung des Histamins auf dem Elektrophorese-Streifen erfolgte durch Besprühen mit Diazoniumsalz. Ueber die papierchromatographische Bestimmung dieses Amins wird im experimentellen Teil berichtet.

Die Hauptmenge der Proteine in den Sekreten dieser Gruppe wandert bei pH 7,0 kathodisch. Bei pH 5,0 konnte bei beiden Giften eine Auftrennung in vier verschiedene Eiweißfraktionen erzielt werden.

Gruppe IV der Spinnentier-Gifte

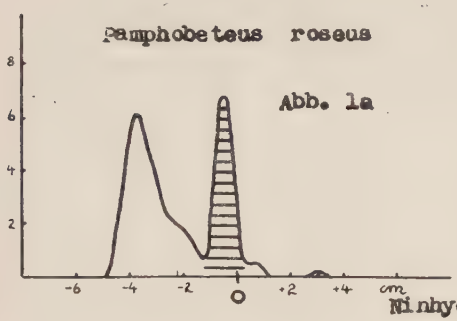
(Die Skorpion-Gifte)

Die Sekrete von Tityus bahiensis und Tityus serrulatus enthalten außer geringen Mengen Lysin (1-2%) keine weiteren Aminosäuren in freier Form. Von den Giften der echten Spinnen unterscheiden sie sich außerdem durch ihren geringen Gehalt an freier

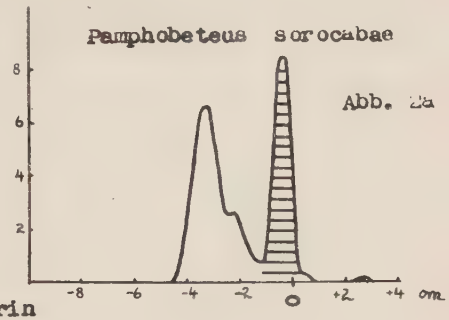
Die papierelektrophoretische Auftrennung der Spinnentier-Gifte

E·10

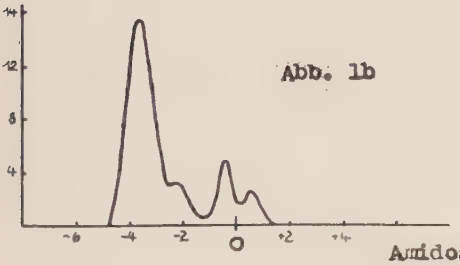
Pamphobeteus roseus

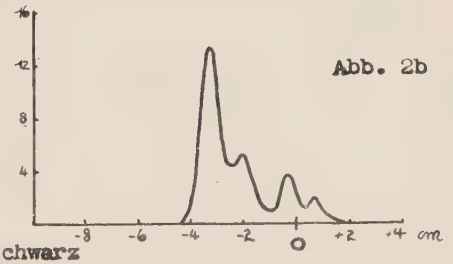


Pamphobeteus sorocabae



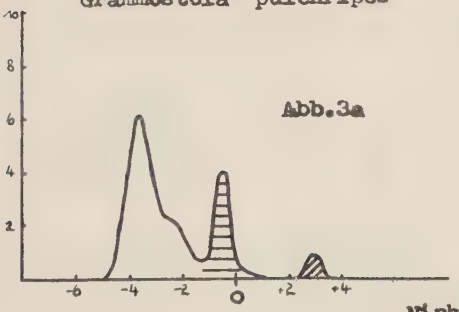
Ninhydrin



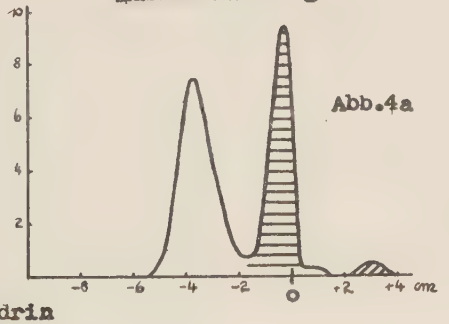


Amidoschwarz

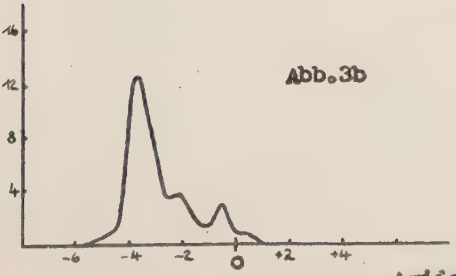
Grammostola pulchripes

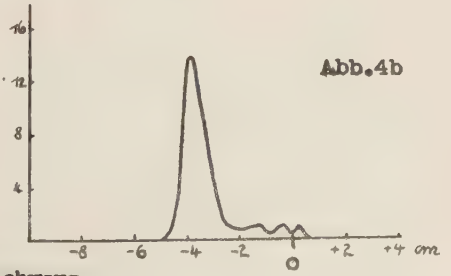


Lasiodora klugii



Ninhydrin





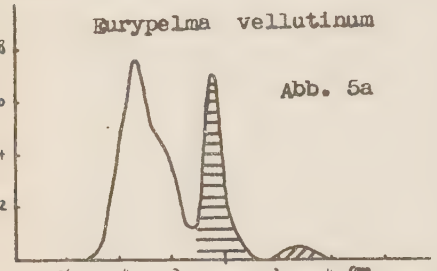
Amidoschwarz

Die papierelektrophoretische Auftrennung der Spinnentier-Gifte

E·10

Eurypelma vellutinum

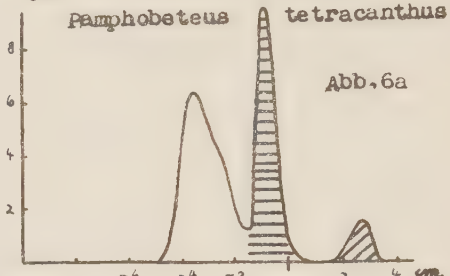
Abb. 5a



E·10

Pamphobeteus tetracanthus

Abb. 6a



Ninhydrin

Abb. 5b

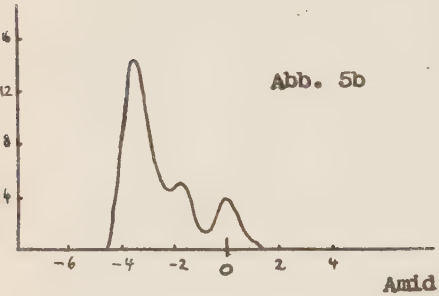
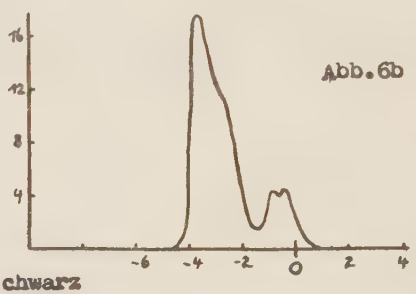


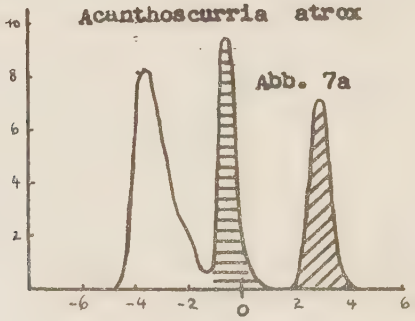
Abb. 6b



Amidoschwarz

Acanthoscurria atrox

Abb. 7a



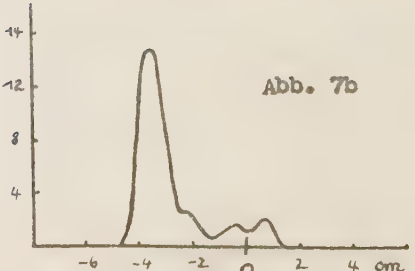
Glutaminsäure
Asparaginsäure

γ-Aminobuttersäure

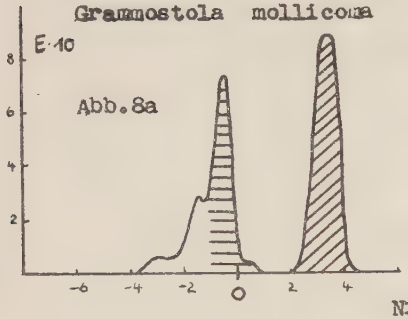
Lysin

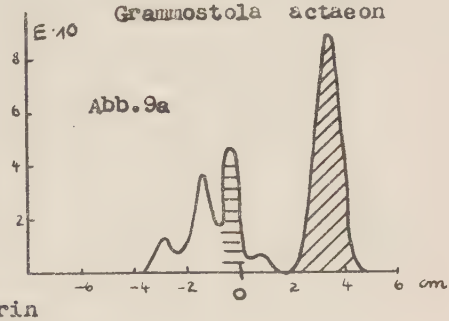
Histamin

Abb. 7b

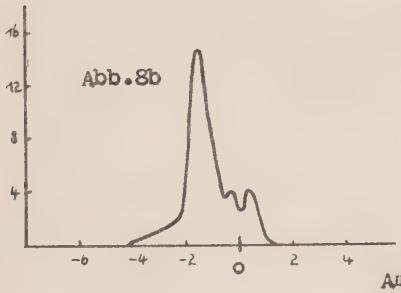


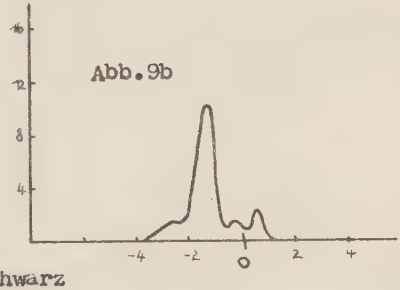
Die papierelektrophoretische Auftrennung der Spinnentier-Gifte



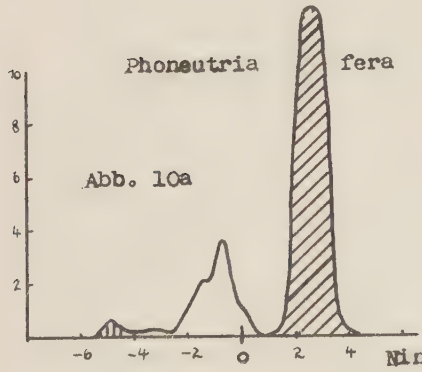


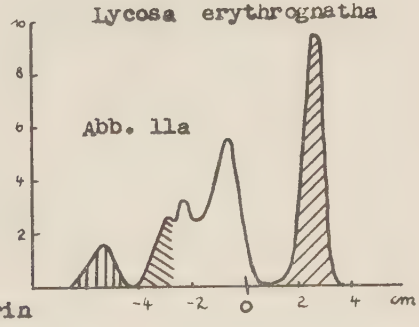
Ninhydrin



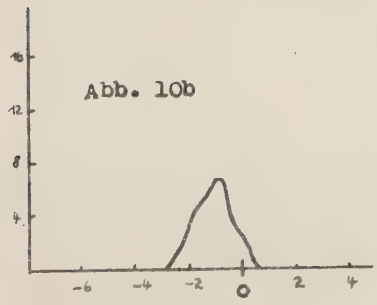


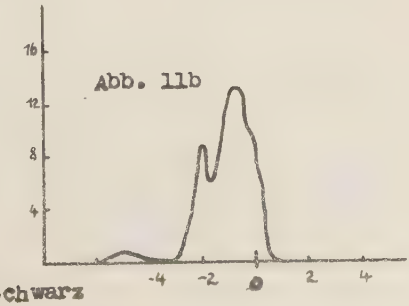
Amidoschwarz





Ninhydrin



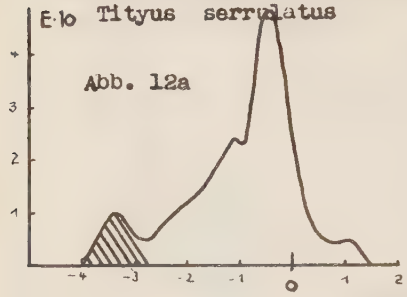


Amidoschwarz

Die papierelektrophoretische Auftrennung der Spinnentier-Gifte

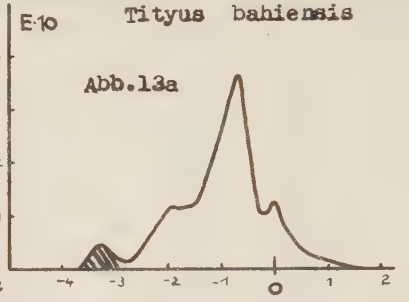
E·10 Tityus serrulatus

Abb. 12a



E·10 Tityus bahiensis

Abb.13a



Ninhydrin

Abb.12b

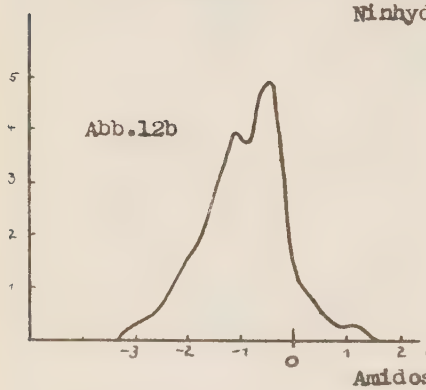
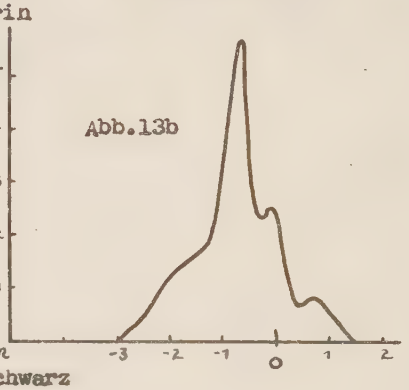


Abb.13b



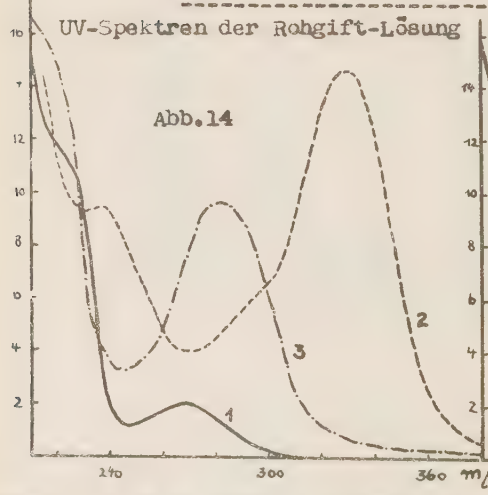
Amidoschwarz

E·10

Die UV-Absorption in den Giften der Gruppe I.

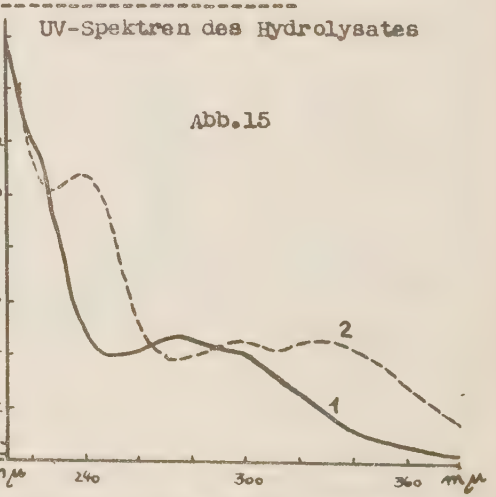
UV-Spektren der Rohgift-Lösung

Abb.14



UV-Spektren des Hydrolysates

Abb.15



Kurve 1: 0,25 mg Gift(G.pulchripes) in 3 ml Wasser gelöst.

Kurve 2: Die alkalisch gemachte Gift-lösung nach 22 Stunden.

Kurve 3: Die alkalische Giftlösung wieder angesäuert.

Kurve 1: 0,25 mg Gift(G.pulchripes) mit 20% E HCl 24 h bei 100° hydrolysiert, und in 3 ml Wasser gelöst.

Kurve 2: Die alkalisch gemachte Lösung des Hydrolysates.

Phosphorsäure. Die Phosphorsäure wandert bei der Elektrophorese mit noch größerer Geschwindigkeit anodisch als die Glutaminsäure und läßt sich mit Molybdatreagens nach Hanes (17), unter Verwendung von $SnCl_2$ als Reduktionsmittel, auf dem Papier nachweisen. Die Reaktion war bei allen Spinnengiften stark positiv, bei den Skorpion-Giften dagegen ist der Gehalt an freier Phosphorsäure nach der sehr schwachen Färbung mit Molybdatreagens zu schließen wesentlich geringer.

Die Elektrophorese-Bilder der Skorpion-Gifte sind auf Tafel V wiedergegeben. Die Proteine wandern bei pH 7,0 nur langsam kathodisch. Eine bessere Trennung wurde bei pH 5,0 erzielt (Versuchsdauer 6,5 h bei einem Spannungsgefälle von 6,4 V/cm). In beiden Giften konnten dabei sechs verschiedene Eiweißfraktionen nachgewiesen werden.

B. Die Aminosäuren-Zusammensetzung einiger Gifte.

Um den Anteil der Proteine am Gesamtgift zu ermitteln und Einblick in die Zusammensetzung der Eiweißstoffe zu erhalten, wurde von einigen Giften die Aminosäuren-Zusammensetzung bestimmt. Die Ausführung der Hydrolyse und die papierchromatographische Bestimmung der Aminosäuren im Hydrolysat erfolgte wie bei den Schlangengiften. Wie dort, so beziehen sich auch hier, die in den Tabellen IV und V zusammengestellten Ergebnisse auf die bei 60° im Vacuum über P_2O_5 getrockneten Substanzen.

Der Tryptophan-Gehalt konnte bei den Giften der Gruppe I infolge der Anwesenheit der UV-Komponenten nicht nach der Methode von Goodwin und Morton (9) ermittelt werden. Bei Grammostola mollicoma wurde die UV-spektroskopische Bestimmung des Tryptophans durch die Anwesenheit von einigen, in kleineren Mengen vorhandenen, bei 260 mμ absorbierenden Komponenten (vermutlich Pyrimidine oder Purine) ebenfalls gestört.

Ueber die Bestimmung der γ-Aminobuttersäure, des Histamins, und des Ammoniak-N sind im experimentellen Teil nähere Einzelheiten zu finden. Bei den Giften der Vogelspinnen waren im Hydrolysat einige zunächst unbekannte ninhydrin-positive Substanzen aufgetaucht. Da sich ein Teil dieser Komponenten im Phenol (pH 1,

Tabelle IV

Die Aminosäuren-Zusammensetzung einiger Spinnentier-Gifte

Aminosäure	gr Aminosäure in 100 gr Rohgift		
	Lasiodora klugii	Pamphobeteus sorocabae	Grammostola actaeon
Cystin	2,7	3,3	4,5
Tyrosin	2,0	1,4	3,5
Valin	1,3	1,2	3,0
Methionin	0,7	0,4	1,9
Asparaginsäure	3,9	3,6	7,8
Glutaminsäure	4,3	4,5	27,2
Serin	1,7	1,9	3,4
Glykokoll	1,8	1,8	3,1
Threonin	1,5	1,3	3,8
Alanin	1,3	1,5	2,8
Lysin	5,1	5,4	8,2
Arginin	3,9	4,3	4,4
Phenylalanin	2,7	2,3	4,1
Isoleucin	1,6	1,8	2,7
Leucin	2,5	1,9	4,0
Prolin	2,2	1,6	4,0
Histidin	1,2	0,7	1,5
Tryptophan	-	-	3,0
γ-Aminobuttersäure	4,4	1,1	1,5
Summe	44,8	40,0	94,4
Aminosäuren-N	6,5 %	6,0 %	12,2 %
Ammoniak-N	-	-	0,77%
N-Wert der Elementaranalyse	11,40 %	10,74 %	13,23%
Verbrennungs-rückstand	6,7 %	4,3 %	4,4 %

T a b e l l e V

Die Aminosäuren-Zusammensetzung einiger Spinnentier-Gifte.

Aminosäure	gr Aminosäure in 100 gr Rohgift		
	Grammostola mollicoma	Phoneutria fera	Tityus bahiensis
Cystin	6,1	7,8	5,4
Tyrosin	2,9	2,7	4,6
Valin	2,2	1,7	3,2
Methionin	2,0	1,4	1,3
Asparaginsäure	7,3	6,8	7,1
Glutaminsäure	27,2	28,7	9,1
Serin	3,0	2,4	4,3
Glykokoll	2,9	3,3	4,1
Threonin	2,7	2,4	3,0
Alanin	1,8	2,5	4,0
Lysin	8,0	6,8	8,1
Arginin	4,1	5,2	4,6
Phenylalanin	3,6	3,2	5,5
Isoleucin	1,6	2,0	3,3
Leucin	3,3	2,5	4,7
Prolin	2,3	2,2	5,8
Histidin	1,4	0,8	1,3
Tryptophan	-	4,4	1,7
γ-Aminobuttersäure	3,8	0,0	0,0
Histamin	0,0	1,0	0,0
Summe	86,2	87,8	81,1
Aminosäuren-N	11,1 %	11,7 %	11,0 %
Ammoniak-N	0,63%	-	-
N-Wert der Elementaranalyse	12,57 %	11,86 %	11,90 %
Verbrennungsrückstand	7,6 %	10,4 %	2,9 %

Chromatogramm mit Tyrosin, Valin und Methionin überlagerte, mußte die Auswertung dieser Aminosäuren im o-Kresol-Chromatogramm vorgenommen werden. Ein weiterer unbekannter Ninhydrinfleck erschien im Phenol (pH 1)-Chromatogramm zwischen Cystin und Asparaginsäure (R_f = 0,14) und im Lutidin-Chromatogramm unterhalb des Lysius (R_f = 0,03). Diese, zunächst bei den Giften der Gruppe I beobachteten, dort intensiven unbekannten ninhydrin-positiven Substanzen waren bei den Giften der Gruppe II nur sehr schwach vertreten, während sie bei den übrigen Spinnentier-Giften vollständig fehlten. Es zeigte sich, daß diese ninhydrin-positiven Komponenten in engem Zusammenhang mit den in den Giften der Vogelspinnen enthaltenen nichtpeptidischen basischen Substanzen (UV-Komponenten) stehen, und aus diesen bei der Hydrolyse gebildet werden. Auf die Untersuchung und Identifizierung dieser Spaltprodukte wird bei der Besprechung der UV-Komponenten selbst näher eingegangen.

C. Nichtpeptidische basische Verbindungen im Gift der Vogelspinnen

Wie bereits erwähnt, sind in den Giften der Gruppe I basische nichtpeptidische Verbindungen enthalten, die zunächst noch nicht identifiziert werden konnten. Da sie sich besonders durch ihre UV-Absorption in alkalischer Lösung auszeichneten, wurden sie kurz als UV-Komponenten bezeichnet. Ihr Anteil am Sekret dieser Vogelspinnen schien nach den Ergebnissen der Aminosäuren-Analyse, welche nur einen Proteingehalt von 35-40 % ergab, sehr beträchtlich zu sein. Ueber Verhalten und Eigenschaften dieser Komponenten soll im folgenden berichtet werden.

1. Die UV-Absorption in Lösung.

Die Anwesenheit einer stark im UV absorbierenden Komponente in den Giften der Gruppe I wurde beim Versuch, den Tryptophan-Gehalt von Lasiodora klugii nach der Methode von Goodwin und Morton (9) UV-spektroskopisch zu bestimmen, entdeckt. Die in 0,1 n NaOH gelöste Substanz zeigte eine intensive Absorption mit Maxima bei 330 und 240 mμ. Die nähere Untersuchung dieser, bei allen Giften der Gruppe I auftretenden Erscheinung, ergab folgende eigenartige Ergebnisse.

In 0,1 n HCl oder in H_2O gelöst zeigen diese Gifte im UV nur ein geringes Absorptionsmaximum bei 270 mμ (Kurve 1 in Abb. 14 auf Tafel V). Macht man diese Lösungen nun durch Zugabe von NaOH alkalisch, so erhält man bei unmittelbar anschließender Messung ein Spektrum mit einem intensiven Maximum bei 240 mμ, und einem zunächst sehr kleinen Maximum bei 330 mμ. Die Extinktion bei 330 mμ nimmt aber rasch zu und übertrifft schließlich das Maximum bei 240 mμ. Die Kurve 2 in Abb. 14 (Tafel V) zeigt das Spektrum einer mit 3 Tropfen 0,1 n NaOH versetzten wässrigen Giftlösung nach 22 h. Stärker alkalisch gemachte Lösungen verändern sich rascher, und streben schneller dem stabilen Endzustand zu, bei dem keine Aenderung der Extinktion mehr eintritt.

Säuert man diese Lösungen mit HCl an, so verschwinden die beiden Maxima bei 240 und 330 mμ; dafür tritt ein neues Maximum bei 280 mμ in Erscheinung (Abb. 14, Kurve 3). Macht man diese Lösung wieder alkalisch, so erhält man sofort, ohne Zeitreaktion, die Kurve 2 in Abb. 14 zurück.

Diese Beobachtungen deuteten darauf hin, daß unbekannte, in den Giften enthaltene Substanzen durch Alkalieinwirkung eine Veränderung erleiden, wobei eine Verbindung entsteht, die in alkalischer Lösung intensiv bei 330 mμ absorbiert, in saurer Lösung dagegen ein Spektrum mit einem Maximum bei 280 mμ besitzt.

Erhitzt man die Gifte der Gruppe I mit gesättigter Barytlösung 24 h bei 100°, so entsteht ebenfalls jene bei 330 mμ absorbierende Komponente, und die Spektren dieser Lösungen in alkalischem bzw. saurem Medium stimmen qualitativ und quantitativ mit den Kurven 2 und 3 in Abb. 14 überein. Die mit HCl hydrolysierten Gifte dagegen zeigen nach Alkalizusatz nur ein kleines Maximum bei 330 mμ, das sofort, ohne Zeitreaktion, in Erscheinung tritt und unverändert erhalten bleibt. (Abb. 15, Tafel V).

2. Das Verhalten bei der Elektrophorese.

Für die weitere Untersuchung war zunächst wichtig festzustellen, wohin die in den Giften der Gruppe I enthaltenen, und in alkalischer Lösung stark UV-absorbierenden Komponenten bei der Elektrophorese wandern, ob sie mit einer ninhydrin- bzw. amidoschwarz-positiven Fraktion identisch sind, oder in eine von diesen Fraktionen eingebaut vorliegen.

Es wurden daher Lösungen dieser Gifte auf Papier aufgetragen und bei pH 7,0 der Elektrophorese unterworfen. Ein, nach dem Trocknen mit Paraffin transparent gemachter Streifen zeigte im UV durchgemessen keinerlei Absorption über 300 mμ. Daraufhin wurde ein zweiter Streifen mit einer 1 n Lösung von NaOH in Methanol besprüht, um durch die alkalische Reaktion die Umwandlung in die bei 330 mμ absorbierende Komponente herbeizuführen. Dabei zeigte sich nach dem Trocknen des Streifens im UV-Licht 3,5-4 cm vom Start in Richtung zur Kathode entfernt, also an der Stelle der stark basischen ninhydrin- und amidoschwarz-positiven Hauptkomponente dieser Gifte (Abb. 1-7, Tafel II und III), eine intensiv leuchtend blaue Fluoreszenz. Die UV-Messung des Streifens ergab, daß mit dieser Fluoreszenz auch eine starke UV-Absorption mit einem Maximum bei 330 mμ zusammenfällt. Damit war gezeigt, daß die unbekannten Substanzen in den Giften der Gruppe I, welche in alkalischer Lösung die starke UV-Absorption hervorrufen, identisch mit den bei der Elektrophorese dieser Sekrete rasch kathodisch wandernden, sowohl mit Ninhydrin, als auch mit Amidoschwarz positiv reagierenden Komponenten dieser Gifte sind, und basische Natur besitzen. Außerdem war als weitere Eigenschaft dieser Verbindungen die leuchtend blaue Fluoreszenz, welche sie nach alkalischer Behandlung im UV-Licht auf dem Papier zeigen, aufgefunden worden.

3. Die papierchromatographische Auftrennung.

Die Einheitlichkeit der UV-Komponenten wurde papierchromatographisch geprüft, und zum Nachweis dabei die leuchtend blaue Fluoreszenz, welche diese Substanzen auf dem Papier nach Behandlung mit Natronlauge geben, verwendet. Die Gifte der Gruppe I selbst zeigen weder in neutraler noch in alkalischer Lösung Fluoreszenz. Auch auf dem Papier treten die UV-Komponenten erst nach Behandlung mit methanolischer NaOH und nach Abtrocknen des Methanols als leuchtende Fluoreszenzflecke in Erscheinung. Die Chromatogramme wurden daher, um die basischen Substanzen unbekannter Zusammensetzung sichtbar zu machen, mit einer 1 n Lösung von NaOH in Methanol besprüht und dann getrocknet.

Die Untersuchung der Giftlösungen in einem zweidimensionalen Chromatogramm mit Phenol (pHl) in der ersten, und n Butanol-Eis-

essig-Wasser (B-E-W 4:1:1) in der zweiten Dimension zeigte in allen Sekreten der Gruppe I die Anwesenheit von drei, mit NaOH auf dem Papier leuchtend fluoreszierenden Komponenten mit folgenden R_f-Werten:

	Phenol (pH 1)	B-E-W
A_1	0,35	0,02
A_2	0,50	0,06
A_3	0,62	0,30

Damit war gezeigt, daß die bei der Elektrophorese einheitlich kathodisch wandernden stark basischen Substanzen sich papierchromatographisch in drei verschiedene Komponenten auftrennen lassen. Zur weiteren Untersuchung wurden die Gifte mit B-E-W (4:1:1) eindimensional absteigend chromatographiert und die Chromatogramme verschiedenen Farbreaktionen und Behandlungen unterworfen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind im folgenden zusammengestellt:

1.) Nach Besprühen mit methanolischer NaOH treten bei allen Giften der Gruppe I drei leuchtend fluoreszierende Flecke in Erscheinung.

	R_f-Wert
A_1	0,02
A_2	0,06
A_3	0,30

Im UV durchgemessen zeigen alle drei fluoreszierende Substanzen das gleiche Absorptionsspektrum wie die alkalischen Lösungen der Rohgifte der Gruppe I mit Maxima bei 330 und 240 mμ. Damit ist wieder, wie schon durch papierelektrophoretische Versuche, bewiesen, daß Fluoreszenz und UV-Absorption von denselben Substanzen verursacht werden. Damit übereinstimmend zeigen die am stärksten fluoreszierenden Flecke A_1 und A_2 auch die stärkste Absorption.

2.) Mit Ninhydrin geben alle drei UV-Komponenten positive Reaktion, wobei A_3 wesentlich schwächer anfärbt als die beiden anderen Komponenten.

3.) Mit Amidoschwarz werden A_1 und A_2 sehr intensiv angefärbt.

4.) Auch mit Phosphormolybdänsäure (PMS) und $SnCl_2$ (21) geben A_1 und A_2 positive Reaktion. Das Chromatogramm wird 1 Minute mit PMS-Lösung getränkt und nach gründlichem Waschen mit

$SnCl_2$-Lösung behandelt. A_1 und A_2 zeigen intensive blaue Färbung; A_3 reagiert nicht. Diese Reaktion zeigt, daß A_1 und A_2 mit PMS schwer lösliche Verbindungen bilden.

5.) Alle drei UV-Komponenten reduzieren Triphenyltetrazoliumchlorid (TTC) zum roten Farbstoff. Am intensivsten ist die Färbung bei A_1 und A_2, wesentlich schwächer bei A_3.

6.) Mit Paulys Reagens besprüht zeigen alle drei UV-Komponenten positive Reaktion. Diese Fähigkeit in sodaalkalischer Lösung mit Diazoniumsalz unter Bildung orangeroter Farbstoffe zu kuppeln, weist auf phenolischen Charakter der Substanzen hin.

7.) Mit Millons Reagens entsteht bei allen drei UV-Komponenten eine weinrote Färbung. Zur Ausführung der Reaktion, die in Lösung erfolgen muß, wurde das Chromatogramm in 1 cm breite Streifen zerlegt, die einzelnen Streifen mit je 1 ml Wasser und 1 ml einer 10%igen Quecksilbersulfat-Lösung in 5%iger Schwefelsäure versetzt, und mit 1 Tropfen einer 0,5%igen Natriumnitrit-Lösung bis zum Sieden erhitzt (54).

8.) Die Reaktion nach Gerngross-Voss-Herfeld auf para-substituierte Phenole mit 1,2-Nitrosonaphthol, die ähnlich wie die Millonsche Probe in Lösung ausgeführt wurde, war ebenfalls bei allen drei UV-Komponenten positiv. Die dabei entstehende kirschrote Färbung war sehr intensiv bei A_1 und A_2, wesentlich schwächer bei A_3.

9.) Alle auf mehrwertige Phenole ausgeführten Reaktionen waren negativ.

10.) Auch mit Ehrlichs Reagens zum Nachweis von Indolderivaten war keine Farbreaktion zu beobachten.

Die weitgehende Uebereinstimmung der drei UV-Komponenten in ihrem spektralen Verhalten, in ihren Eigenschaften und Reaktionen, weisen darauf hin, daß es sich um drei chemisch sehr nahestehende Individuen handeln muß. Der positive Ausfall der Paulyschen und Millonschen Reaktion läßt auf phenolischen Charakter schließen und zwar handelt es sich wie die Reaktion von Gerngross-Voss-Herfeld zeigt offenbar um para-substituierte Phenole. Ihre Färbung mit Ninhydrin andererseits deutet auf aliphatisch gebundene Aminogruppen hin, während die Reaktion mit Phosphormolybdänsäure bei A_1 und A_2 stark basische Bestandteile in diesen Komponenten anzeigt.

4. Nachweis und Identifizierung einiger Spaltprodukte.

Auf Grund der Farbreaktion mit Ninhydrin und Amidoschwarz könnte man vermuten, daß jene die Fluoreszenz und UV-Absorption verursachenden phenolischen Komponenten, mit Aminosäuren oder Peptiden verbunden vorliegen. Eine Verknüpfung der UV-Komponenten mit den Proteinen war auf Grund folgender Beobachtungen unwahrscheinlich:

Mit 5 %-iger Trichloressigsäure lassen sich die Eiweißstoffe aus den wässrigen Lösungen der Gifte ausfällen, während die UV-Komponenten unverändert in Lösung bleiben. Auch bei der Hitzekoagulation findet keine Fällung der unbekannten Substanzen mit den Proteinen statt. Andererseits war es möglich, die UV-Komponenten aus dem getrockneten Rohgift mit ammoniakhaltigem Methanol zu eluieren, während die Eiweißstoffe ungelöst zurückblieben. Mit reinem Methanol lassen sich die UV-Komponenten nicht herauslösen, wahrscheinlich deshalb, weil sie im Rohgift an Säuren (vermutlich Phosphorsäure) gebunden vorliegen und erst durch den Zusatz von Ammoniak als Basen in Freiheit gesetzt werden.

Die chromatographische Untersuchung des nach dem Abdunsten des Methanols mit Wasser aufgenommenen Eluats zeigte, wie beim Rohgift, eine Auftrennung in drei, mit Natronlauge fluoreszierende, ninhydrin- und TTC-positive Komponenten. Auch das spektrale Verhalten der mit Methanol und Ammoniak herausgelösten Substanzen war vollkommen analog dem der UV-Komponenten im Rohgift. In neutraler Lösung zeigten sie keine wesentliche Absorption über 240 mμ, während bei Zusatz von Natronlauge jene bei 330 mμ absorbierende Komponente gebildet wird, die dann beim Ansäuern der Lösung ihr Maximum nach 280 mμ verschiebt. Wie diese Untersuchungen zeigten, lassen sich also die UV-Komponenten durch ammoniak-haltiges Methanol im wesentlichen unverändert, zusammen mit den im Gift in freier Form vorliegenden Aminosäuren, eluieren, während die Proteine ungelöst zurückbleiben.

Zur weiteren Aufklärung wurden die mit Methanol und Ammoniak eluierten UV-Komponenten von P. tetracanthus mit gesättigter Bariumhydroxyd-Lösung 24 h bei 100° erhitzt, und dann chromatographisch und papierelektrophoretisch untersucht. Außer der γ-Aminobuttersäure und der Glutaminsäure, die im Gift der Vogel-

spinnen frei vorliegen und daher mit Methanol zusammen mit den UV-Komponenten in Lösung gingen, war keine von den übrigen Aminosäuren in größeren Mengen im Hydrolysat zu finden. Durch dieses Ergebnis wurde eine Verknüpfung der UV-Komponenten mit den bekannten Aminosäuren ausgeschlossen. Doch waren in diesem alkalischen Hydrolysat zwei intensiv ninhydrin-positive, im Gift ursprünglich selbst nicht enthaltene, Substanzen aufgetreten, die mit keiner der üblichen Aminosäuren identisch waren und offenbar aus den UV-Komponenten bei der Hydrolyse abgespalten wurden. Im Phenol(pH 1)-Chromatogramm wandern beide mit fast identischen R_f-Werten (R_f= 0,14) und erscheinen dort meist als einheitlicher Fleck unterhalb der Asparaginsäure. Durch zweidimensionale Trennung mit Phenol (pH 1) in der ersten, und B-E-W (4:1:1) in der zweiten Dimension war es möglich, beide voneinander zu trennen und zu unterscheiden. Die eine Komponente, die intensivere von beiden, bleibt in B-E-W am Start zurück (R_f= 0,00), während die andere mit einem R_f-Wert von etwa 0,1 wandert.

Beide Substanzen werden auch bei der sauren Hydrolyse gebildet, und waren daher bereits bei der Aminosäurenbestimmung im Gift der Vogelspinnen als unbekannte Flecke aufgetaucht (siehe dort). Allerdings ist bei der sauren Hydrolyse der Abbau der UV-Komponenten nur unvollständig und daher die gebildete Menge jener ninhydrin-positiven Spaltprodukte wesentlich geringer als im alkalischen Hydrolysat.

Die mit einem "Pherographen" ausgeführten papierelektrophoretischen Untersuchungen der alkalisch gespaltenen UV-Komponenten zeigten, daß die beiden unbekannten ninhydrin-positiven Substanzen stark basische Natur besitzen und noch wesentlich schneller als die basischen Aminosäuren Lysin und Arginin zur Kathode wandern. Der von der Firma Hormuth in Heidelberg hergestellte "Pherograph" entspricht im Prinzip dem von Graßmann und Hannig entwickelten Elphorgerät, arbeitet aber mit höheren Spannungen bei gleichzeitiger Kühlung, und erwies sich für eine rasche und scharfe Trennung niedermolekularer Substanzen sehr brauchbar. Es war auf diese Weise möglich, die beiden unbekannten ninhydrin-positiven Spaltprodukte der UV-Komponenten, die auf Grund ihrer basischen Eigenschaften im folgenden kurz als B_1 und B_2 bezeichnet werden sollen, sowohl voneinander, als auch von den übrigen Aminosäuren abzutrennen und näher zu untersuchen. Als Elektrolyt wurde ein Gemisch

von Pyridin, Eisessig und Wasser (100:10:890) mit einem pH-Wert von 6,5 verwendet. Die neutralen Aminosäuren bleiben bei diesem pH am Start, Asparaginsäure (+ 5,0 cm) und Glutaminsäure (+4,3 cm) wandern anodisch, während sich Lysin (-5,8 cm), Arginin (-5,2 cm) und ebenso die unbekannten Basen B_1 (-11,6 cm) und B_2 (-14,8 cm) zur Kathode bewegen. Die in Klammern angeführten Zahlen bezeichnen den zur Kathode (-) bzw. zur Anode (+) nach einer Versuchsdauer von 90 Minuten bei einem Spannungsgefälle von 13 Volt/cm zurückgelegten Weg.

Die beiden, auf diese Weise getrennten unbekannten ninhydrin-positiven Substanzen zeigten im Gegensatz zu den UV-Komponenten im Rohgift weder Fluoreszenz noch UV-Absorption, und ließen sich auch mit Diazoniumsalz nicht kuppeln. Sie waren also offenbar aliphatischer Natur. Mit PMS und $SnCl_2$ (21) gab nur die Komponente B_1 positive Reaktion. Auf Grund dieser unterschiedlichen Eigenschaft gegenüber PMS war es nun möglich, die beiden elektrophoretisch abgetrennten Komponenten B_1 und B_2 mit den bei der zweidimensionalen Chromatographie der alkalischen Hydrolysate erhaltenen zwei unbekannten ninhydrin-positiven Flecke in Beziehung zu bringen. B_1 erwies sich dabei mit jener, in B-E-W in der zweiten Dimension am Start zurückbleibenden (R_f = 0,0), B_2 dagegen mit der anderen, in B-E-W mit einem R_f-Wert von 0,1 wandernden Komponente identisch.

Die rasche kathodische Wanderung und die geringen R_f-Werte der beiden unbekannten ninhydrin-positiven Substanzen im Phenol (pH 1)- und B-E-W-Chromatogramm, sowie die Reaktion mit PMS und $SnCl_2$ bei B_1, weisen auf stark basische Substanzen hin. Diaminomonokarbonsäuren wie z.B. Ornithin und Oxylysin, zeigen zwar ähnliches chromatographisches Verhalten, konnten aber elektrophoretisch ausgeschlossen werden, da sie ähnlich wie Lysin und Arginin viel langsamer als B_1 und B_2 wandern. Es lag daher die Vermutung nahe, daß es sich bei den unbekannten ninhydrin-positiven Substanzen um Amine handeln könne, die ja ähnlich wie die Aminosäuren mit Ninhydrin unter Bildung eines violetten Farbstoffs zu reagieren vermögen. Einfache Amine, wie Aethanolamin, Aethylamin und seine Homologen, besitzen in Phenol und B-E-W verhältnismäßig große R_f-Werte und konnten daher ausgeschlossen werden. Ein, den unbekannten Substanzen ähnliches chromatographisches Verhalten war dagegen nach den Angaben der Literatur bei den niedermolekularen Diaminoverbindungen, sowie bei Spermin und Spermidin zu erwarten.

Besonders naheliegend war es zunächst, Spermin und Spermidin als Vergleich heranzuziehen, da beide Verbindungen ähnlich wie B_1 in B-E-W keine Wanderung zeigen, und in weiterer Uebereinstimmung, mit PMS schwer lösliche Verbindungen zu bilden vermögen. Die in dieser Richtung unternommenen Versuche ergaben ein vollständig gleiches chromatographisches und elektrophoretisches Verhalten von Spermin und B_1. Es konnte Uebereinstimmung der R_f-Werte in vier verschiedenen Chromatogrammen, und gleiche Wanderungsgeschwindigkeit in zwei elektrophoretischen Versuchen bei pH 6,5 und pH 3,5 festgestellt werden. Spermidin dagegen, das sowohl bei der Elektrophorese (bei pH 6,5), als auch im Phenol (pH 1)-Chromatogramm schneller als B_1 wandert, war eindeutig auszuschließen.

Nachdem es auf diese Weise gelungen war B_1 mit Spermin

$$H_2N\,(CH_2)_3NH(CH_2)_4NH(CH_2)_3NH_2$$

zu identifizieren, konnte an die Aufklärung der zweiten ninhydrin-positiven Komponente B_2 herangegangen werden. Da diese Verbindung bei der Elektrophorese noch schneller als B_1 wandert, und mit PMS keine schwer lösliche Verbindung gibt, lag die Annahme eines niedermolekularen Diamins nahe, zumal sich eine dem Trimethylen- und Tetramethylen-Diamin analoge Gruppierung von drei bzw. vier Methylengruppen zwischen zwei Stickstoffatomen auch im Spermin vorfindet.

Von den untersuchten Diaminen zeigte Trimethylendiamin vollständige Uebereinstimmung der R_f-Werte mit B_2 im Phenol (pH 1)- und B-E-W-Chromatogramm, sowie gleiche Wanderungsgeschwindigkeit bei den elektrophoretischen Untersuchungen bei pH 6,5 und 3,5, während Aethylendiamin, Tetra- und Penta-Methylendiamin sowohl chromatographisch, als auch elektrophoretisch mit Sicherheit ausgeschlossen werden konnten.

Nachdem es auf diese Weise gelungen war, durch vergleichende papierchromatographische und papierelektrophoretische Versuche, die bei der Hydrolyse der UV-Komponenten gebildeten zwei ninhydrin-positiven Substanzen als Spermin und Trimethylendiamin zu identifizieren, war auch eine quantitative Bestimmung dieser Spaltprodukte möglich geworden. Zu diesem Zweck wurde Gift von P. tetracanthus bei 60° im Vacuum bis zur Gewichtskonstanz getrocknet, eingewogen, und 24 h mit gesättigter Bariumhydroxydlösung bei 100° erhitzt, und die Lösung anschließend mit Schwefelsäure neutralisiert. Die elektrophoretisch von den Aminosäuren abgetrennten

Basen wurden mit Ninhydrin angefärbt, in den Kupferkomplex übergeführt, und photometrisch in Lösung bestimmt. Die Ergebnisse, bezogen auf die Einwaage, betrugen:

B_1	Spermin	9,4 %
B_2	Trimethylendiamin	2,7 %

Von Interesse war nun festzustellen, aus welchen von den drei UV-Komponenten diese basischen Verbindungen abgespalten werden. Es wurden daher die Komponenten A_1, A_2 und A_3 zunächst papierchromatographisch mit B-E-W getrennt, aus dem Papier einzeln eluiert, und mit 20%-iger HCl 24h bei 100° hydrolysiert. Die papierchromatographische und elektrophoretische Untersuchung dieser Hydrolysate ergab, daß aus A_1 nur Spermin, aus A_3 nur Trimethylendiamin in Freiheit gesetzt wird, während bei der sauren Hydrolyse von A_2 beide Basen als Spaltprodukte auftreten. Damit fand auch die Tatsache, daß nur A_1 und A_2 mit PMS positive Reaktion zeigten, ihre Erklärung, da die Fähigkeit mit PMS schwer lösliche Verbindungen zu bilden eben auf die in diesen Substanzen enthaltene Spermin-Komponente, welche in A_3 fehlt, zurückzuführen ist.

Damit war die Frage nach den in den UV-Komponenten eingebauten basischen Verbindungen gelöst. Zu untersuchen blieben noch die phenolischen Bestandteile dieser Komponenten.

Aehnlich wie mit Methanol-Ammoniak lassen sich die UV-Komponenten mit Methanol bei Zusatz von NaOH aus dem Rohgift eluieren, werden hierbei aber gleichzeitig infolge der stärker alkalischen Reaktion unter Bildung jener intensiv bei 330 mμ absorbierenden Verbindung verändert.

Zur näheren Untersuchung wurden 3 mgr Gift von P. tetracanthus mit 2 ml Methanol und 2 Tropfen einer 1 n methanolischen NaOH versetzt und 20 h eluiert. Die von den ungelöst gebliebenen Proteinen abzentrifugierte Lösung wurde eingedunstet, ohne zu neutralisieren mit Wasser aufgenommen, und unter Verwendung von B-E-W als Verteilungsmedium chromatographisch untersucht. Mit methanolischer Lauge besprüht zeigte das Chromatogramm eine leuchtend fluoreszierende Komponente, welche mit einem R_f-Wert von etwa 0,4 wandert, während eine, mit einem R_f von 0,9 wandernde Substanz als dunkler Fleck unter der Quarzlampe sichtbar wurde. Im UV durchmessen zeigte jene schnell wandernde Komponente (R_f 0,9) ein intensives Maximum bei 330 mμ, und ein kleines Maximum

bei 240 mμ, während die ebenfalls, wenn auch viel schwächer, im UV absorbierende leuchtend fluoreszierende Komponente (R_f= 0,4) ein Spektrum mit einem Maximum bei 240 mμ aufwies.

Die mit einem R_f-Wert von 0,4 wandernden Komponenten (offenbar handelt es sich um mehrere gleich schnell wandernde Verbindungen) reduzieren TTC, zeigen mit Ninhydrin, Diazoniumsalz und Millons Reagens positive Reaktion, und wandern bei der Elektrophorese kathodisch.

Die, auf dem alkalisch gemachten Streifen intensiv bei 330 mμ absorbierende Verbindung, die in B-E-W mit einem R_f-Wert von 0,9 wandert, besitzt in neutraler bzw. saurer Lösung, wie die Messung eines nicht mit NaOH besprühten Chromatogrammstreifens zeigte, eine kürzerwellige Absorption mit einem Maximum bei 280 mμ. Sie reagiert weder mit TTC, noch mit Ninhydrin, liefert mit Diazoniumsalz nur eine gelbe Färbung, zeigt aber mit Millons Reagens eine deutlich positive Reaktion (weinrote Färbung). Da diese Komponente bei der Elektrophorese bei pH 7,0 nicht wandert, muß sie neutrale Eigenschaften besitzen.

Damit war gezeigt, daß bei Einwirkung von Alkali auf die UV-Komponenten eine phenolische Verbindung, die in alkalischer Lösung bei 330 mμ, in neutraler bei 280 mμ maximal absorbiert, und neutrale Eigenschaften besitzt, gebildet wird, unter gleichzeitiger Abspaltung von den ninhydrin-positiven basischen Bestandteilen dieser Substanzen.

Auf Grund des charakteristischen spektralen Verhaltens war es möglich, diese Komponente als p-Oxybenzaldehyd zu identifizieren. Von allen in der Literatur durchgesehenen Spektren phenolischer Verbindungen, zeigten nur p-Oxybenzaldehyd und p-Oxyacetophenon analoges Verhalten. Beide absorbieren intensiv im UV und besitzen in alkalischer Lösung Maxima bei 330 und 240 mμ, während in saurer Lösung die Absorption nach kürzeren Wellen mit einem Maximum bei 280 mμ verschoben wird (25). Daß es sich bei jener, in alkalischer Lösung aus den UV-Komponenten abgespaltenen Verbindung, die in B-E-W mit einem R_f-Wert von 0,9 wandert, tatsächlich um eine Karbonylverbindung handelt, konnte durch Besprühen des Chromatogramms mit Dinitrophenylhydrazin nachgewiesen werden.

Eine Unterscheidung ob P-Oxybenzaldehyd oder p-Oxyacetophenon vorliegt, war in diesem Chromatogramm nicht möglich, da beide Ver-

bindungen in B-E-W den gleichen, mit jener unbekannten Substan. aber vollkommen übereinstimmenden R_f-Wert von 0,9 besitzen. Es mußten daher Lösungsmittel gesucht werden, welche eine Trennung von p-Oxybenzaldehyd und p-Oxyacetophenon gestatteten. Als geeignet dafür erwiesen sich n-Butanol mit 5 n NH_3 gesättigt (23), n-Butanol mit Karbonatpuffer gesättigt (24), und ein Gemisch aus n-Butanol-Benzol-Karbonatpuffer im Verhältnis 80 : 5 : 15 (24) Die R_f-Werte in diesen Lösungsmitteln waren:

	p-Oxybenzaldehyd	p-Oxyacetophenon
n-Butanol, 5n NH_3	0,29	0,38
n-But.-Karbonatp.	0,68	0,80
n-But.-Benzol-Puffer	0,54	0,72

Aus allen diesen Chromatogrammen ging eindeutig hervor, daß jene, durch die Einwirkung von NaOH auf die UV-Komponenten entstehende Verbindung mit p-Oxybenzaldehyd identisch ist. Sowohl die R_f-Werte, wie auch die Farbreaktionen mit Diazoniumsalz bzw. Dinitro-Phenylhydrazin waren vollkommen analog jenen von p-Oxybenzaldehyd, und verschieden vom p-Oxyacetophenon.

Die quantitative Bestimmung des gebildeten p-Oxybenzaldehyds war nun auf Grund der UV-Absorption mit Hilfe des in der Literatur (25) angegebenen molaren Extinktionskoeffizienten bei 330 mμ ($\lg \varepsilon = 4{,}44$) möglich. Die bei P. tetracanthus ausgeführte Messung ergab

9,5 % p-Oxybenzaldehyd

Die Messung der UV-Absorption wurde nach 40stündigem Stehen des in 0,1 n NaOH gelösten Giftes vorgenommen. Auch durch Erhitzen der Lösung war nach dieser Zeit keine weitere p-Oxybenzaldehyd-Bildung, d.h. keine weitere Extinktionszunahme bei 330 mμ mehr zu beobachten.

Da alle drei UV-Komponenten nach ihrer Auftrennung in B-E-W bei alkalischer Behandlung jenes intensive Maximum bei 330 mμ zeigen, muß angenommen werden, daß bei allen drei Verbindungen p-Oxybenzaldehyd abgespalten wird.

Bei der papierchromatographischen und elektrophoretischen Untersuchung der mit Methanol und NaOH aus den Vogelspinnengiften eluierten Substanzen konnte weder Spermin, noch Trimethylendiamin in freier Form nachgewiesen werden. Die nach der Abspaltung von

p-Oxybenzaldehyd veränderten Komponenten besitzen basische Eigenschaften und wandern mit ähnlicher Geschwindigkeit wie die unveränderten UV-Komponenten im Rohgift zur Kathode. Sie zeigen mit Ninhydrin und auch noch mit Diazoniumsalz (orangerote Färbung) positive Reaktion, besitzen also offenbar noch phenolische Eigenschaften. Bereits die Tatsache, daß auf Grund der quantitativ ausgeführten Millonschen Probe bei P. tetracanthus ein Gehalt vor 16,7 % p-Oxybenzaldehyd zu erwarten gewesen wäre, während die UV-spektroskopische Bestimmung nur 9,5 % ergab, deutete darauf hin, daß nur ein Teil der in den UV-Komponenten gebundenen phenolischen Reste als p-Oxybenzaldehyd abgespalten wird.

Die endgültige Abtrennung der basischen Verbindungen Spermin und Trimethylendiamin von den phenolischen Bestandteilen der UV-Komponenten erfolgt erst durch Einwirkung von Alkali in der Hitze. (Hydrolyse mit Baryt, 24 h bei 100°). Außer p-Oxybenzaldehyd und p-Oxybenzoesäure, die beide mit Paulys Reagens eine Gelbfärbung liefern, sind im alkalischen Hydrolysat noch zwei saure, mit Diazoniumsalz unter Bildung roter Farbstoffe kuppelnde phenolische Bestandteile enthalten. Eine dieser Komponenten ist mit p-Oxyphenylessigsäure, die andere wahrscheinlich mit p-Oxyphenylmilchsäure identisch. Nachweis und Identifizierung dieser Säuren erfolgte chromatographisch mit n-Butanol-Aethanol-Ammonkarbonatpuffer (24) als Verteilungsmedium. (R_f-Werte: p-Oxyphenylessigsäure 0,36; p-Oxyphenylmilchsäure 0,30; p-Oxybenzoesäure 0,25).

Offenbar liegen also, nach den Ergebnissen dieser Versuche zu schließen, in jedem Molekül der UV-Komponenten mindestens zwei verschieden gebaute phenolische Reste vor, von denen einer bereits bei milder alkalischer Behandlung in Form des p-Oxybenzaldehyds abgetrennt wird, und die Ursache jener intensiven UV-Absorption bei 330 mμ ist, die diesen Substanzen zunächst den Namen UV-Komponenten eingetragen hat, während die anderen phenolischen Komponenten erst unter den Bedingungen der alkalischen Hydrolyse bei 100° von den basischen ninhydrin-positiven Substanzen getrennt, und als p-Oxyphenylessigsäure bzw. p-Oxyphenylmilchsäure in Freiheit gesetzt werden. Die p-Oxybenzoesäure entsteht wahrscheinlich sekundär aus p-Oxybenzaldehyd.

D. Die Diskussion der Ergebnisse

Die untersuchten Spinnen- und Skorpion-Gifte besitzen ähnlich wie die Sekrete der Schlangen im wesentlichen Eiweißnatur. Aber im Gegensatz zu den Schlangengiften enthalten die Sekrete der Spinnentiere fast alle auch größere Mengen an freien Aminosäuren. Besonders erstaunlich ist der hohe Gehalt an Glutaminsäure und γ-Aminobuttersäure einiger Gifte.

Die Glutaminsäure ist in der Natur am Aufbau vieler Proteine wesentlich mitbeteiligt, und entsteht besonders reichlich bei der Hydrolyse von Gliadin und Hordein. Gewisse Bakterien (Bac. anthracis und Bac. subtilis) sind sogar in der Lage Polypeptide, die nur Glutaminsäure enthalten, aufzubauen. In freier Form ist Glutaminsäure im Blut und in tierischen Geweben, besonders im Gehirn, enthalten. Ihr Anteil beträgt aber dort weniger als 1 % des Trockengewichtes, während im Gift der Spinnen von mir maximal bis zu 23,6 % an freier Glutaminsäure gefunden wurde.

Die γ-Aminobuttersäure, die genetisch wahrscheinlich eng mit der Glutaminsäure verknüpft ist und aus dieser vermutlich durch Dekarboxylierung gebildet wird, ist in freier Form in vielen pflanzlichen und tierischen Gewebeextrakten zu finden. Entdeckt wurde diese Aminosäure zum erstenmal 1947 von Dent (47) bei der papierchromatographischen Untersuchung von Kartoffelextrakten, und konnte bald darauf auch in der Hefe (48), in Bakterien (49), im Gehirn und in pflanzlichen Geweben (50) nachgewiesen werden. In tierischen Giften jedoch war meines Wissens das Auftreten der γ-Aminobuttersäure bisher noch nicht beobachtet worden. Sie konnte von mir in den Giftsekreten aller hier untersuchten Vogelspinnen, wo sie maximal bis zu 7,1 % (L.klugii) vorkommt, nachgewiesen werden, während sie in den übrigen Spinnentier-Giften vollständig fehlte.

Außer Glutaminsäure und γ-Aminobuttersäure waren in einigen Giften noch Asparaginsäure und Lysin, wenn auch in wesentlich geringerer Konzentration, in freier Form vertreten.

In den Sekreten von Lycosa erythrognatha und Rhoncutria [illegible] konnte außer den freien Aminosäuren noch Histamin nachgewiesen

werden. Histamin gehört zu den biogenen Aminen und findet sich in der Natur z.B. im Mutterkorn (51), in den Haaren der Brennnesseln(52), und ist auch im Gift der Honigbiene enthalten (53).

Der Proteingehalt der Spinnentier-Gifte läßt sich aus den Ergebnissen der Aminosäuren-Analyse (Tabellen IV und V) berechnen, wenn man berücksichtigt, daß abgesehen von den frei vorkommenden Aminosäuren, pro Mol Aminosäure 1 Mol Wasser bei der Hydrolyse aufgenommen wird. Auf diese Weise ergibt sich bei den Giften der Gruppe I ein Eiweißgehalt von etwa 35-40 %, während für alle anderen untersuchten Spinnentier-Gifte die Summe aus Protein und freien Aminosäuren 75-85 % beträgt.

Kohlehydrate sind in den Spinnentier-Giften nur in sehr geringer Menge enthalten. Hexosen und Aminozucker konnten keine nachgewiesen werden, während die Reaktion auf Pentosen mit Phloroglu zin und Salzsäure bei allen Giften mit Ausnahme von G.actaeon, L. erythrognatha, und den beiden Skorpiongiften, positiv war. Zur Identifizierung und quantitativen Bestimmung der Pentose wurde Gift von P. tetracanthus und L. klugii 5 Stunden mit 0,1 n Schwefelsäure hydrolysiert und dann papierchromatographisch untersucht. Es konnte eindeutig Ribose nachgewiesen werden, doch war ihr Anteil am Gesamtgift in beiden Fällen kleiner als 0,2 %.

Die Summe der anorganischen Bestandteile wurde bei der Stickstoffbestimmung einiger Gifte in Form des Verbrennungsrückstandes erfaßt. Die Ergebnisse dieser, von Schoeller in Kronach ausgeführten Mikrobestimmungen sind am unteren Ende der Tabellen IV und V angeführt. Einen wesentlichen Bestandteil, des zum Teil sehr beträchtlichen Glührückstandes, dürfte die in allen Fällen nachgewiesene Phosphorsäure ausmachen. In Uebereinstimmung mit dem geringen Gehalt an Phosphorsäure ist bei Tityus bahiensis der Aschegehalt am geringsten.

Vergleicht man die, in den Tabellen IV und V angeführten Stickstoffwerte der Elementaranalyse mit den aus den Aminosäuren-Analysen berechneten, so zeigt sich, daß, abgesehen von den Giften der Gruppe I, praktisch aller Stickstoff durch die Aminosäureanalyse erfaßt worden war. Als Summe von Protein, Aminosäuren und Glührückstand erhält man bei diesen Sekreten 85-95 %

Der fehlende Betrag dürfte auf Lipoide und vielleicht noch andere in geringer Menge vorhandene, organische Verbindungen zurückzuführen sein.

Anders liegen die Verhältnisse bei den Giften der Gruppe I, wo Proteine, Aminosäuren und Glührückstand nur etwa 50 % des Gesamtgiftes ausmachen. Auch die aus den Aminosäuren berechneten N-Werte liegen wesentlich tiefer als die elementaranalytisch ermittelten. Diese Differenzen sind auf die in diesen Giften enthaltenen nichtpeptidischen basischen Verbindungen zurückzuführen. Die quantitative Bestimmung der Spaltprodukte Spermin (9,4 %), Trimethylendiamin (2,7 %) und p-Oxybenzaldehyd (9,5 %) bei P.tetrac. ergab, daß auf 1 Mol Base 1 Mol p-Oxybenzaldeyd entfällt. Die übrigen phenolischen Komponenten, die als p-Oxyphenylessigsäure bzw. p-Oxyphenylmilchsäure abgespalten werden, dürften nach den Ergebnissen der quantitativ ausgeführten Millonschen Reaktion ähnlich wie p-Oxybenzaldehyd etwa 10% des Rohgiftes betragen. (Eine genauere quantitative Bestimmung dieser Spaltprodukte war nicht möglich.) Als Summe aller nachgewiesenen und identifizierten Spaltprodukte erhält man so bei P. tetracanthus etwa 32 % des Rohgiftes. Die Hauptmenge der UV-Komponenten scheint damit erfaßt zu sein. Ueber Aufbau und Konstitution dieser Verbindungen läßt sich bisher noch nichts Eindeutiges aussagen.

In den Sekreten von G. actaeon und G. mollicoma (Gruppe II der Spinnentiergifte) sind die nichtpeptidischen basischen Verbindungen nur in sehr geringen Mengen (1-2 %) enthalten. In allen anderen Giften (Gruppe III und IV) fehlen sie vollständig.

IV. Zusammenfassung

Es sollte die chemische Zusammensetzung einiger Gifte von Schlangen, Spinnen und Skorpionen mit neueren Methoden erforscht werden. Untersucht wurden die Sekrete der drei Schlangen Naja haje, Naja nigricollis und Echis carinatus, sowie die Gifte von zwei Skorpionen (Tityus serrulatus und Tityus bahiensis) und elf südamerikanischen Spinnen.

Bei der Untersuchung und Auftrennung der Schlangengifte wurde die Elektrophorese nach Tiselius, sowie die Methode der Säulenchromatographie herangezogen. Die Bestimmung der Aminosäuren-Zusammensetzung der Giftsekrete und der aus ihnen elektrophoretisch bzw. säulenchromatographisch abgetrennten Proteinfraktionen erfolgte papierchromatographisch.

Für die Auftrennung der Spinnentier-Gifte, die ähnlich wie die Schlangengifte im wesentlichen Eiweißnatur besitzen, wurde das Verfahren der Papierelektrophorese herangezogen. Die in diesen Sekreten zum Teil sehr reichlich enthaltenen freien Aminosäuren (Glutaminsäure, γ-Aminobuttersäure, Asparaginsäure und Lysin), ebenso wie das in zwei Giften aufgefundene Histamin wurden papierchromatographisch nachgewiesen und bestimmt. Von mehreren Giften wurde auch die gesamte Aminosäuren-Zusammensetzung ermittelt.

Mehrere, nur in den Giften der Vogelspinnen auftretende basische Verbindungen phenolischen Charakters konnten noch nicht restlos aufgeklärt werden. Als Spaltprodukte dieser Verbindungen wurden p-Oxybenzaldehyd, p-Oxybenzoesäure, Spermin, Trimethylendiamin, p-Oxyphenylessigsäure und p-Oxyphenylmilchsäure nachgewiesen. Trimethylendiamin war damit erstmalig in einem Naturprodukt, Spermin zum ersten Mal in gebundenem Zustand aufgefunden worden.

Ueber einige Verbesserungen und Ergänzungen zur papierchromatographischen Bestimmung von Aminosäuren, sowie über eine Methode zur Bestimmung kleiner Mengen Ammoniak in Proteinhydrolysaten zur Erfassung des Amidstickstoffs wird im experimentellen Teil berichtet.

EXPERIMENTELLER TEIL

I. ZUR METHODIK DER ELEKTROPHORESE.

Die elektrophoretische Auftrennung der Schlangengifte wurde mit einer Tiselius-Apparatur nach E. Wiedemann (22) ausgeführt.

Die beiden, nach dem Spaltverfahren aufgenommenen Bilder der Elapiden-Gifte zeigen die Auftrennung der Gifte in einer präparativen Zelle nach 18 600 sec. (Naja haje) bzw. nach 10 560 sec. (Naja nigricollis) Versuchsdauer. Die Konzentration der Proteinlösung betrug in beiden Fällen etwa 1 %, die Stromstärke wurde konstant auf 52 mA gehalten.

Das nach dem Interferenz-Verfahren aufgenommene Bild des Echis carinatus-Giftes zeigt die Auftrennung dieses Proteingemisches in einer analytischen Zelle bei einem pH von 3,0 nach 8 460 sec. Die Konzentration der Giftlösung betrug hier 0,23 %, die Stromstärke war 25 mA.

Da bei den Spinnentier-Giften nur geringe Substanzmengen zur Verfügung standen, wurde zu ihrer elektrophoretischen Untersuchung nicht die Methode der freien Elektrophorese nach Tiselius, sondern das Verfahren der Papierelektrophorese herangezogen. Die Ausführung erfolgte im wesentlichen nach der von Grassmann und Hannig (15) beschriebenen Methode mittels eines Elphor-H-Gerätes.

Zwei Streifen aus Whatman Nr. 1 Papier (4 x 30 cm) wurden mit Puffer getränkt und horizontal in eine Elektrophoresekammer eingespannt, wobei die beiden Enden der Streifen in die mit Puffer gefüllten Elektrodenkammern tauchen. Als Puffer wurden Veronal-Pufferlösungen nach E. Wiedemann (16) verwendet.

Die in wenig Wasser gelösten Gifte wurden mittels einer Mikropipette in der Mitte der Streifen aufgetragen um sowohl anodisch, als auch kathodisch wandernde Bestandteile zu erfassen und dann bei einer Spannung von 110 Volt der Elektrophorese unterworfen. Infolge der Anwesenheit von freien Aminosäuren war es notwendig, die Versuchsdauer verhältnismäßig kurz zu wählen, um einerseits die schnell wandernden niedermolekularen Verbindungen

noch als scharfe Linien zu erfassen, und andererseits auch die Proteine möglichst weitgehend voneinander zu trennen. Die besten Ergebnisse wurden im allgemeinen nach 4 Stunden Versuchsdauer bei einem pH von 7,0 erhalten.

Nach dem Herausnehmen aus der Elektrophoresekammer wurden die Papierstreifen bei 100° getrocknet und mit Ninhydrin bzw. Amidoschwarz angefärbt. Ninhydrin macht Aminosäuren und in schwächerem Maße auch Proteine sichtbar, während Amidoschwarz nur die Proteine anfärbt.

Die Ninhydrin-Reaktion wurde wie bei der papierchromatographischen Bestimmung der Aminosäuren ausgeführt, und die Ninhydrinfärbungen durch Besprühen mit einer Lösung von Kupfernitrat in Alkohol, in die Kupferkomplexe verwandelt. Zur Auswertung wurden die Streifen dann mit Paraffin transparent gemacht, mit monochromatischem Licht (515 mμ, Beckman-Photometer) durchleuchtet, und mittels eines Schiebers mm förmm an der Photozelle vorbeibewegt. Die graphische Darstellung der dabei gemessenen Extinktionen als Funktion des Weges ergibt dann jene im allgemeinen Teil dieser Arbeit wiedergegebenen Elektrophorogramme.

Das Anfärben der Proteine mit Amidoschwarz B 10 erfolgte nach der Methode von Grassmann und Hannig (15). Die Auswertung wurde aber von mir im Gegensatz zu diesen Autoren mit monochromatischem Licht bei 620 mμ unter Verwendung eines Beckman-Photometers analog wie bei den Ninhydrin-Färbungen ausgeführt.

II. ZUR METHODIK DER SAEULENCHROMATOGRAPHIE.

Die technischen Einzelheiten der Säulenchromatographie, wie Vorbereitung und Puffern des Austauschers, Füllen der Säulen, Durchführung der fraktionierten Trennung mittels eines Fraktomaten, wurden im wesentlichen nach dem von Stein und seinen Mitarbeitern angegebenen Verfahren ausgeführt (5).

Als Austauscher diente das Harz Amberlite IRC-50 (XE-64). Als Pufferlösungen wurden 0,2 m Natriumphosphat-Puffer verwendet.

Die Dimension der Säulen für die analytischen Versuche betrug 1 x 35 cm (Ausflußgeschwindigkeit 1,5 - 2 ml/Stunden), während

für die präparative Trennung Säulen von 3 x 55 cm mit einer Ausflußgeschwindigkeit von etwa 10 ml in der Stunden verwendet wurden.

Die in Abständen von 20 Minuten aufgefangenen Fraktionen wurden mit Ninhydrin auf ihren Proteingehalt untersucht. Bei den analytischen Versuchen wurden dafür aus jedem Reagensglas 0,4 oder 0,5 ml herauspipettiert, bei den präparativen Trennungen genügte es jedem zweiten oder dritten Reagensglas 0,2 ml für die Ninhydrinreaktion zu entnehmen. Als Reagens diente das von Cocking und Jemm (26) angegebene, welches sich durch geringeren Ninhydrinbedarf, durch geringere Empfindlichkeit gegenüber Ammoniak, sowie durch niedrigere und konstantere Leerwerte vor dem Moore'schen Reagens auszeichnet. Nur wurden von mir aus praktischen Gründen die Volum- und Konzentrationsverhältnisse etwas anders gewählt und an Stelle von Aethanol-Wasser Methanol-Wasser als Verdünnungsflüssigkeit verwendet.

Die mit 1 oder 2 Tropfen HCl auf pH 5 gebrachten Probeentnahmen wurden mit je 1 ml Reagenslösung A und B versetzt, 15 Minuten bei 100° erhitzt, 5 Minuten abgekühlt, und mit 5 ml Methanol-Wasser (3:2 v/v) verdünnt.

Lösung A : 0,1 m Zitratpufferlösung vom pH 5,0

Lösung B : 1 gr Ninhydrin in 100 ml Methylzellosolv mit 2 ml einer 0,01 m Kaliumcyanidlösung.

Die Messung der Extinktion erfolgte bei 570 mμ gegen den Blindwert der Reagenzlösungen.

III. ERGAENZUNGEN UND VERBESSERUNGEN ZUR PAPIERCHROMATOGRAPHISCHEN BESTIMMUNG DER AMINOSAEUREN.

Nachweis und Bestimmung der Aminosäuren in den von mir untersuchten Giften wurden im wesentlichen nach dem Verfahren von Fischer und Dörfel (7) ausgeführt. Einige von mir angebrachte Ergänzungen bzw. Verbesserungen zu dieser Methode sollen nun im folgenden beschrieben werden.

1. Die Bestimmung von Serin bei Gegenwart von Cystin.

Ist in dem zu untersuchenden Eiweißhydrolysat Cystin abwesend, so kann Serin im Phenol (pH 12)- Chromatogramm zusammen mit Asparaginsäure, Glutaminsäure, Glykokoll, Threonin und Alanin ausgewertet werden. Sowohl McFarren (8) als auch Fischer und Dörfel (7) haben dieses Chromatogramm zur Bestimmung dieser Aminosäure verwendet. Da nun aber Cystin nur wenig schneller als Serin wandert, und beide nicht voneinander getrennt sind, ist bei Gegenwart von Cystin die Auswertung des Serins im Phenol (pH 12)-Chromatogramm nicht ohne weiteres möglich. In diesem Fall läßt sich Serin in einem eigenen Chromatogramm mit Phenol (pH 6,2) als Verteilungsmedium bestimmen. Dieses Lösungsmittel trennt Serin sowohl von Cystin, als auch von allen übrigen, in Eiweißhydrolysaten gewöhnlich vorkommenden Aminosäuren. Einen eigenen Chromatographierkasten für die Serinbestimmung einzurichten ist nicht nötig, da sich die Trennung mit Phenol (pH 6,2) ohne weiteres im Phenol (pH 12)-Kasten ausführen läßt.

Mc Farren hat zwar in seinen systematischen Untersuchungen (8) die Verteilung der Aminosäuren in dem mit Puffer vom pH 6,2 gesättigten Phenol untersucht und die R_f-Werte in diesem Lösungsmittel in seinen Tabellen aufgeführt, aber weder von ihm, noch von anderen Autoren ist bisher dieses Verteilungsmedium zur Serinbestimmung verwendet worden. Wie meine Untersuchungen bei einer Analyse von Elfenbein ergaben, ist das mit Puffer vom pH 6,2 gesättigte Phenol außerdem auch zum Nachweis und zur Bestimmung von Oxylysin geeignet (27).

2. Nachweis und Bestimmung der γ-Aminobuttersäure.

Die γ-Aminobuttersäure reagiert wie die α-Aminosäuren mit Ninhydrin unter Bildung eines blauvioletten Farbstoffes und kann im Phenol (pH 1)-Chromatogramm, wo sie unterhalb des Tyrosins erscheint, erkannt werden. Da Sarkosin in diesem Chromatogramm den gleichen R_f-Wert besitzt, muß zur eindeutigen Unterscheidung ein zweidimensionales Chromatogramm mit Phenol(pH 1) in der ersten, und n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) in der zweiten Dimension zu Hilfe genommen werden. In der zweiten Dimension bleibt Sarkosin beträchtlich hinter der γ-Aminobuttersäure zurück.

Auf dem normalen, mit Puffer pH 1,0 (0,2 m) getränkten Phenol (pH1)-Chromatogramm sind γ-Aminobuttersäure und Tyrosin meist nicht scharf getrennt. Doch läßt sich die für die quantitative Bestimmung beider Aminosäuren notwendige einwandfreie Trennung erreichen, wenn man das Papier mit einer Mischung aus 0,2 m Puffer vom pH 1 mit 2n-HCl im Verhältnis 1 : 1 vorbehandelt. Die Auftrennung der übrigen Aminosäuren wird durch die stärker saure Reaktion des Papieres in keiner Weise geändert.

Im Phenol (pH 12)-Chromatogramm besitzen Tyrosin und γ-Aminobuttersäure die gleichen R_f-Werte. Tyrosin muß daher, wenn γ-Aminobuttersäure anwesend ist, ebenfalls im Phenol(pH 1)-Chromatogramm oder mit o-Kresol(pH 6,2) bestimmt werden.

3. Die quantitative Bestimmung des Prolins mit Isatin.

Prolin reagiert mit Ninhydrin unter Bildung eines gelben Farbstoffes, der aber zur quantitativen Auswertung nicht geeignet ist. Wesentlich empfindlicher ist die Farbreaktion mit Isatin, die zu einer blauen Verbindung führt, die sich auch quantitativ auswerten läßt und daher zur Bestimmung dieser Aminosäure verwendet wird.

Hydrolysat und Vergleichslösung werden punktförmig auf das Papier aufgetragen. Nach der Verteilung der Aminosäuren durch ein geeignetes Lösungsmittel wird das Prolin mit Isatinreagens angefärbt und direkt auf dem Papier ausgewertet.

Als Verteilungsmedium wird in der Literatur n-Butanol-Eisessig-Wasser (28) oder auch tert. Butanol-Methyläthylketon-Wasser (2:1:1) (7) vorgeschlagen. Doch sind die mit diesen Lösungsmittelgemischen erhaltenen Prolinflecke meist ungleichmäßig und wenig symetrisch. Von mir gemachte Untersuchungen zeigten, daß die Flecke wesentlich schöner und einheitlicher werden, wenn man die Verteilung auf gepuffertem Papier mit gepufferten Verteilungsmedien vornimmt. Am geeignetsten erwies sich ein Gemisch von tert.-Butanol mit Phosphatpuffer vom pH 6,2 im Verhältnis 4:1 (oder die Mischung von tert.-Butanol, Methyläthylketon und Puffer (pH 6,2) im Verhältnis 2 : 2 : 1.) Diese Lösungsmittel trennen Prolin von allen übrigen Aminosäuren ab und liefern

gleichmäßige, gut auswertbare Flecke (Laufzeit des Lösungsmittels 35 - 40 Stunden absteigend, Laufstrecke etwa 25 cm, R_f-Wert des Prolins 0,25-0,30) . Das Anfärben des Prolins erfolgt mit einem in der Literatur mehrfach verwendeten Reagens von 0,4 % Isatin in wassergesättigtem essigsäurehaltigem n-Butanol. Um maximale Extinktionen zu erzielen war infolge der Verwendung von gepuffertem Papier ein Gehalt von 8 % Essigsäure notwendig. Zur Entwicklung der Farbe wurde das Chromatogramm 10 Minuten bei 100° erhitzt.

Zur Auswertung der Flecke wird aus dem Chromatogramm ein 3 cm breiter Streifen senkrecht zur Laufrichtung des Lösungsmittels mit den Prolinflecken in seiner Mitte ausgeschnitten und mit Paraffin getränkt. Die auf diese Weise transparent gemachten Flecke werden dann an einer Photozelle vorbeibewegt und mit monochromatischem Licht (610 mμ) ausphotometriert. Die in Abständen von 1 mm gemessenen Extinktionen trägt man graphisch als Funktion des Weges auf und mißt mit Hilfe eines Planimeters die von den Kurven mit der Grundlinie gebildeten Flächen, welche der Konzentration proportional sind, aus. Aus dem Verhältnis der Flächen von Vergleich und Analyse lassen sich dann die unbekannten Prolinkonzentrationen berechnen.

Die in der Literatur vielfach angewandte maximum density-Methode, bei der nur die maximale Extinktion gemessen wird, ist zwar einfacher und weniger zeitraubend, liefert aber weniger genaue Ergebnisse als die planimetrische Auswertung der Gesamtkurve.

4. Die papierchromatographische Bestimmung des Histidins.

Histidin läßt sich am besten durch seine Farbreaktion mit Diazoniumsalz nachweisen und bestimmen. Die Kupplung zum roten Farbstoff kann entweder in Lösung, oder auf dem Papier erfolgen. Das erste Verfahren, welches auch von Fischer und Dörfel (7) in ihren Arbeiten angewandt wurde, erfordert jedoch eine Einwaage von etwa 1 mgr Protein, während sich die Papierchromatographische Bestimmung bei gleicher Genauigkeit mit nur 30-50 mm^2 eines 1 %igen Proteinhydrolysates ausführen läßt. Der zweite, auch von mir eingeschlagene Weg ist daher besonders dann vorzuziehen, wenn nur wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung steht und die Aminosäuren-Analyse mit möglichst wenig Substanz ausgeführt werden soll.

Bereits von Block (29) wurde ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung des Histidins auf dem Papier angegeben. Das von mir ausgearbeitete, und im nachfolgenden beschriebene Verfahren weicht jedoch in mancher Hinsicht davon ab.

Als Verteilungsmedium für die punktförmig aufgetragenen Aminosäuren wurde ein Gemisch von n-Butanol, Eisessig und Wasser im Verhältnis 4:1:1 verwendet. Dieses Lösungsmittel hat gegenüber dem von Block angewandten Gemisch (n-Butanol-Eisessig-Wasser 100:24:100) den Vorteil, daß es Histamin und Histidin gut trennt und daher auch bei Anwesenheit von Histamin die Bestimmung des Histidins gestattet. Das Anfärben erfolgte abweichend von Block (29) durch Besprühen mit einer Lösung von festem Diazoniumsalz in Sodalösung. Auch in der Art der Auswertung, die der des Prolins analog ist, nur daß die Messungen bei 516 mμ ausgeführt wurde, unterscheidet sich meine Methode von seiner. Zur Berechnung der Konzentration dienen wieder die planimetrisch ausgemessenen Flächen der erhaltenen Kurven. Die von Block angewandte maximum density-Methode, bei der nur die maximale Extinktion der Flecke bestimmt wird, ist zwar einfacher und weniger langwierig, dafür aber auch wesentlich ungenauer. Nachfolgendes Beispiel zeigt, daß die von mir zur Berechnung verwendeten Flächen viel weitgehender der Konzentration proportional sind als die Maxima.

Histidin	Fläche	Maximum	Verhältnis der
1,14 γ	290	0,227	Konzentrationen 2 : 3 : 4
1,71 "	410	0,278	Flächen 2 : 2,83: 4,06
2,28 "	588	0,480	Maxima 2 : 2,45: 4,22

Die Einzelheiten der Ausführung:

Man läßt das Gemisch von n-Butanol-Eisessig-Wasser (4:1:1) absteigend 15 Stunden einwirken. Nach dem Trocknen des Chromatogramms wird mit einer frisch hergestellten Lösung von 50 mgr Diazoniumsalz der Sulfanilsäure in Sodalösung (3 ml gesättigte Sodalösung und 7 ml Wasser) besprüht und im kalten Luftstrom getrocknet. Wie bei Prolin werden die Flecke auf einem 3 cm breiten Streifen ausgeschnitten, mit Paraffin getränkt und bei 516 mμ auf dem Papier photometrisch ausgewertet.

5. Nachweis und Bestimmung von Histamin.

Zum Nachweis des Histamins kann das zur Histidinbestimmung verwendete n-Butanol-Eisessig-Wasser -Chromatogramm herangezogen werden. Histamin reagiert ebenfalls mit Diazoniumsalz unter Bildung eines roten Farbstoffes, besitzt aber einen etwas größeren R_f-Wert als Histidin und stört daher dessen Auswertung nicht.

Zur quantitativen Bestimmung des Histamins wurde die mit Ninhydrin entstehende Färbung im Phenol (pH 1)-Chromatogramm verwendet, die sich analog wie bei den Aminosäuren nach der Ueberführung in den Kupferkomplex mit Methanol eluieren und in Lösung photometrisch auswerten läßt. Histamin besitzt im Phenol (pH 1)-Chromatogramm einen R_f-Wert von 0,45 und erscheint dort, von allen Aminosäuren einwandfrei getrennt, zwischen Alanin und Tyrosin.

6. Nachweis und Bestimmung der Aminozucker.

Die beiden Aminozucker Glucosamin und Galaktosamin sind zuweilen am Aufbau von Proteiden beteiligt und können daher auch in Eiweißhydrolysaten auftreten. Da sie wie die Aminosäuren mit Ninhydrin positiv reagieren, muß ihre Anwesenheit bei der Bestimmung der Aminosäuren berücksichtigt werden. So läßt sich Alanin bei Gegenwart von Glucosamin nicht im Phenol (pH 12)-Chromatogramm auswerten, da Glucosamin in diesem Lösungsmittel den gleichen R_f-Wert besitzt. In diesem Fall muß die Bestimmung des Alanins im Phenol (pH 1)-Chromatogramm erfolgen. Andererseits läßt sich aber die Ninhydrinreaktion dieser Aminozucker zu ihrer Erkennung und quantitativen Bestimmung verwenden. Ihre Anwesenheit macht sich im Phenol(pH 1)-Chromatogramm durch einen ninhydrin-positiven Fleck zwischen Cystin und Asparaginsäure bemerkbar. Doch ist die Unterscheidung, ob Glukosamin oder Galaktosamin vorliegt nicht möglich, da beide in diesem Lösungsmittel fast den gleichen R_f-Wert besitzen. Galaktosamin wandert etwas schneller als Glucosamin, ist aber von diesem nicht einwandfrei getrennt.

Tritt bei der Aminosäuren-Analyse in Phenol(pH 1)-Chromatogramm zwischen Asparaginsäure und Cystin eine ninhydrin-positiv Substanz auf, so muß zur Unterscheidung ob Glucosamin oder Gala

tosamin vorliegt ein anderes Verteilungsmedium und anderes Färbeverfahren zu Hilfe genommen werden. Die Aminozucker besitzen im Gegensatz zu den Aminosäuren reduzierende Wirkung, und lassen sich daher mit Triphenyltetrazoliumsalz (TTC) analog wie die Zucker sichtbar machen. Für ihre Trennung wurde von mir das, für die Lysin- und Argininbestimmung verwendete Lösungsmittel Lutidin (pH 6,2) geeignet gefunden. Man läßt dieses Verteilungsmedium 20 Stunden absteigend einwirken und entwickelt dann das Chromatogramm mit TTC in der für die Bestimmung der Zucker üblichen Weise. Galaktosamin wandert in diesem Chromatogramm etwa 9,5 cm und Glucosamin 12,0 cm. Die Reaktion mit Ninhydrin läßt sich in diesem Fall nicht verwenden, da eine Trennung der Aminozucker von den Aminosäuren in diesem Chromatogramm nicht stattfindet.

Wenn nur einer der beiden Aminozucker im Hydrolysat zugegen ist, so kann seine quantitative Bestimmung mit Ninhydrin im Phenol (pH 1)-chromatogramm erfolgen. Liegt sowohl Glucosamin als auch Galaktosamin vor, dann muß zur quantitativen Bestimmung die Färbung mit TTC im Lutidin-Chromatogramm herangezogen werden.

IV. Eine Methode zur Mikrobestimmung von Ammonium-Ionen in Proteinhydrolysaten.

Im folgenden soll eine Methode beschrieben werden, welche es ermöglicht, mit etwa 40-100 mm^3 eines 1%igen Proteinhydrolysates den Gehalt an Ammonium-Ionen mit einer Genauigkeit von $\pm$ 2-3 % zu bestimmen.

Die Kenntnis der im Hydrolysat enthaltenen Ammoniak-Menge ist wichtig für die Stickstoffbilanz einer Analyse, da auf diese Weise sowohl der Amidstickstoff, wie auch der Stickstoff der bei der Hydrolyse eventuell zersetzten Aminosäuren erfaßt wird. Andererseits bietet diese Methode auch die Möglichkeit, den Gehalt von Amidstickstoff allein in einem Protein zu bestimmen, wenn man die Bedingungen der Hydrolyse so wählt, daß zwar alle Amidbindungen gespalten werden, aber noch keine merkliche Zersetzung von Aminosäuren eintritt.

Schema der Methode:

10-100 mm^3 des Hydrolysates werden mit Magnesiumoxyd schwach alkalisch gemacht, und das in Freiheit gesetzte Ammoniak wird nach dem Prinzip der Mikrodiffusion in einem Tropfen Schwefelsäure absorbiert. Die Bestimmung des diffundierten Ammoniaks erfolgt dann kolorimetrisch mit Ninhydrin unter Zusatz von Kaliumcyanid.

Die von Conway in die analytische Chemie eingeführte Methode der Mikrodiffusion (31) wurde nach ihm von zahlreichen Autoren in verschiedenen Varianten angewandt. Einerseits zur Bestimmung von Ammoniak und Harnstoff in biologischen Flüssigkeiten (32), andererseits um den Gesamtstickstoff organischer Substanzen zu ermitteln (33) (34) (35) (36). Die Bestimmung des mit Kaliumkarbonat oder Natronlauge abgetrennten Ammoniaks erfolgte dann entweder titrimetrisch mit Lauge aus einer Kapillarbürette (31) (33) (34) oder kolorimetrisch mit Nesslers Reagens (31) (35) (32) (37).

Für die Bestimmung von Ammonium-Ionen in sauren Proteinhydrolysaten wurde das Verfahren der Mikrodiffusion bisher noch nicht angewandt. Nur Warner und Cannan bedienten sich bei ihren Untersuchungen über das Verhalten von Proteinen in alkalischen Lösungen der Conway'schen Diffusionstechnik zur Bestimmung des gebildeten Ammoniaks (38). Die übrigen Verfahren zur Ermittlung der Ammonium-Ionen in partiellen und vollständigen Hydrolysaten verwenden die Austreibung des Ammoniaks in einer Mikrokjeldahl-Apparatur (39) (40) (41) oder das Aerationsverfahren von van Slyke (42) (43) (44) (45) und bestimmen das Ammoniak nach Adsorption in vorgelegter Säure. Diese Methoden setzen alle größere Mengen Protein und Hydrolysat voraus.

Die Bestimmung kleiner Mengen Ammonium-Ionen in Hydrolysaten erfolgte bisher nur säulenchromatographisch zusammen mit der Bestimmung von Aminosäuren nach der Methode von Moore und Stein.

Bei dem hier beschriebenen Verfahren zur Mikrobestimmung von Ammonium-Ionen wird das Ammoniak durch Diffusion aus dem Hydrolysat abgetrennt und ähnlich wie bei der Säulenchromatographie kolorimetrisch mit Ninhydrin bestimmt.

Die Reaktion zwischen Ninhydrin und Aminosäuren bzw. Ammonium-Ionen wurde besonders eingehend zuerst von Moore und Stein stu-

diert und zur quantitativen Bestimmung kleiner Mengen säulenchromatographisch abgetrennter Aminosäuren in Lösung angewandt (46).

Das von diesen Autoren angegebene Reagens besitzt folgende Zusammensetzung:

50 ml Zitratpuffer pH 5,0 (0,2 m); 0,08 gr $SnCl_2 \cdot 2\ H_2O$;
2 gr Ninhydrin und 50 ml Methylzellosolv.

Das Zinnchlorür dient dazu, einen Teil des Ninhydrins zu Hydrindantin zu reduzieren.

C. Cocking und Jemm (6) haben dieses Reagens zur Bestimmung von Aminosäuren verbessert, und an Stelle des Zinn-2-chlorids Kaliumcyanid als Reduktionsmittel verwendet. Dieses verbesserte Reagens benötigt nur die Hälfte der Ninhydrinmenge, liefert geringere und besser reproduzierbare Leerwerte, ist beständiger und braucht daher nicht unter Stickstoff aufbewahrt werden. Als weiteren Vorteil geben die Autoren die geringe Empfindlichkeit der Reagenslösung gegenüber Ammoniak an, das unter den gegebenen Bedingungen im Gegensatz zu den quantitativ reagierenden Aminosäuren nur 33 % des theoretischen Farbwertes liefert.

Cocking und Jemm verwenden auf 1 gr Ninhydrin 2 ml einer 0,01 m KCN-Lösung und erhitzen das Gemisch von Zitratpuffer und Ninhydrinreagens mit der zu untersuchenden Substanz 15 Minuten bei 100°.

Eine von mir durchgeführte systematische Untersuchung der Reaktion zwischen Ammonium-Ionen und Ninhydrin bei wechselnden Mengen Kaliumcyanid und verschiedenen Reaktionszeiten zeigte, daß sich auch die Umsetzung des Ammoniaks mit Ninhydrin bei Verwendung von KCN quantitativ gestalten läßt, wenn man die Cyanidkonzentration noch niedriger wählt als Cocking und Jemm (0,7 ml 0,01 m KCN auf 1 gr Ninhydrin) und die Erhitzungsdauer auf 35 Minuten erhöht.

Zunächst wurde bei verschiedenen KCN-Mengen die Kurve für 10, 20 und 30 Minuten Reaktionszeit (bei 100°) aufgestellt, um die optimale Konzentration zu ermitteln (Abb. 1). Diese liegt bei 0,7 ml einer 0,01 m KCN-Lösung pro 1 gr. Ninhydrin.

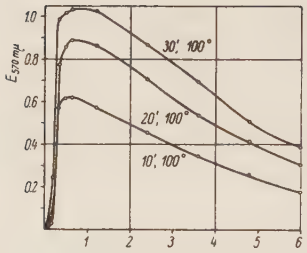


Abb. 1. Ninhydrinreaktion mit 22,6 μg NH_4Cl bei verschiedenen KCN-Mengen und verschiedenen Reaktionszeiten. Abszisse: m*l* 0,01-*m*. KCN auf 1 g Ninhydrin.

Weitere, unter Verwendung dieser optimalen KCN-Menge ausgeführte Versuche bei 30, 40, 50 und 60 Minuten Reaktionszeit zeigten, daß zwischen 30 und 40 Minuten noch eine Zunahme der Extinktion erfolgt, darüber hinaus aber wieder eine Abnahme der Farbintensität eintritt. Unter den so gefundenen optimalen Bedingungen (0,7 ml 0,01 m KCN pro 1 gr Ninhydrin und eine Reaktionszeit von 35 Minuten bei 100°) erhält man die gleichen Extinktionen wie mit Moore's Reagens, die übrigen Vorteile der Cocking-Jemm'schen Reagenslösung wie Ninhydrinersparnis, geringere Leerwerte, größere Beständigkeit der Reagenslösungen bleiben erhalten.

Um die Leerwerte möglichst niedrig zu halten, ist es notwendig KCN und Ninhydrin erst kurz vor der Reaktion zu vereinigen. Aus diesem Grunde wurde das Kaliumzyanid zur Zitratpufferlösung hinzugefügt und die beiden für sich beständigen Lösungen Ninhydrin in Methylzellosolv einerseits, und KCN-haltige Zitratlösung andererseits getrennt in das Reagenzglas pipettiert und so erst unmittelbar vor der Reaktion vereinigt.

Welche Rolle das Kaliumcyanid bei dieser Reaktion spielt, ist noch ungeklärt. Um eine Reduktion des Ninhydrins zu Hydrindantin, das dann mit Ammoniak im stöchiometrischen Verhältnis unter Bildung des blauen Farbstoffes reagieren soll, wie andere Autoren glauben, kann es sich dabei nicht ausschließlich handeln, denn wie meine Untersuchungen zeigten, vermag bereits 1 Mol KCN mehr als das 10fache an Ammonium-Ionen umzusetzen, und bei einem höheren Gehalt an KCN wird sogar die Ausbeute an Farbstoff wesentlich geringer.

Ausführung der Bestimmung

1. Die Abtrennung des Ammoniaks

Die Abspaltung und Diffusion des Ammoniaks erfolgt in kleinen Erlenmeyer-Kölbchen (15-20 ml), die mit einem Gummistopfen dicht verschlossen werden. Die Stopfen sind unten mit einer kleinen Bohrung versehen und dienen zugleich als Halter für kleine Löffelchen aus Glas, die den zur Ammoniakabsorption nötigen Tropfen Schwefelsäure enthalten.

Um möglichst große Genauigkeit zu erhalten, werden in einem Ansatz mehrere Bestimmungen zugleich ausgeführt und die Einzelergebnisse gemittelt. Stehen größere Mengen des Proteinhydrolysates zur Verfügung, so pipettiert man am besten je 0,1 ml der Lösung in die Kölbchen und fügt weiter 0,4 ml Wasser hinzu. Soll dagegen die Ammoniakbestimmung mit möglichst wenig Hydrolysat ausgeführt werden, so ist es am zweckmäßigsten 10-20 mm^2 der Lösung mittels einer entsprechenden Mikropipette auf flächengleiche Stücke (2 x 1,5 cm) von Whatman-Papier aufzutragen (unter Verwendung eines Föns zum Trocknen) und diese nach dem Ausschneiden im Kölbchen mit 0,6 ml Wasser zu versetzen.

Das Freimachen des Ammoniaks erfolgt durch Einwerfen einer Pille aus Magnesiumoxyd und Kochsalz. Zunächst mit Aetznatron angestellte Versuche zeigten, daß bei stark alkalischer Reaktion einige Aminosäuren (bes. Cystin) schon bei Zimmertemperatur eine merkliche Zersetzung unter Bildung von Ammoniak erleiden. Bei Verwendung von Magnesiumoxyd läßt sich dagegen keine zersetzende Wirkung feststellen. Der Zusatz von Natriumchlorid dient mehreren Zwecken:

1. um die Pille zum Zerfall zu bringen und das Magnesiumoxyd möglichst fein zu verteilen;
2. um die Löslichkeit des Ammoniaks in der Bodenflüssigkeit herabzusetzen und damit die Diffusionszeit zu verkürzen;
3. um den Dampfdruck der Bodenflüssigkeit zu erniedrigen und die Bildung von Kondensationswasser (welches Ammoniak absorbieren könnte) an den Wänden des Gefäßes während der Diffusion zu verhindern.

Nachdem Analysensubstanz und Wasser in das Kölbchen gebracht sind, wirft man eine solche aus MgO und NaCl bestehende Pille hinein, und verschließt sofort mit dem Gummistopfen, welcher das Löffelchen trägt, in dem sich ein kleiner Tropfen einer etwa 0,5 n Schwefelsäure befindet.

Durch vorsichtiges Bewegen des Kölbchens bringt man die Pille zum Zerfall und läßt dann über Nacht stehen. Im Laufe von 15-20 Stunden diffundiert dann das frei werdende Ammoniak quantitativ in die Schwefelsäure.

Infolge der stets vorhandenen Spuren von Ammoniak im Wasser, im Papier und in der Luft, ist es notwendig, die durch die Farbreaktion mit Ninhydrin erhaltenen Extinktionen jeweils auf zugehörige, d.h. unter gleichen Bedingungen erhaltene Leerwerte zu beziehen. Aus diesem Grunde wird zusammen mit den Analysen eine entsprechende Zahl von Kölbchen zur Ermittlung solcher Blindwerte angesetzt, indem an Stelle von 0,1 ml Hydrolysat 0,1 ml Wasser bzw. leeres Papier von entsprechender Größe in analoger Weise den Diffusionsbedingungen unterworfen wird.

2. Die Bestimmung des Ammoniaks

Nach 15-20 Stunden ist alles Ammoniak quantitativ in die Schwefelsäure diffundiert. Man zieht nun die Löffelchen aus den Stopfen heraus und läßt sie in Reagensgläser, welche 1 ml der Lösung A enthalten gleiten, fügt 1 ml Lösung B hinzu und erhitzt das Gemisch 35 Minuten in einem siedenden Wasserbad.

Lösung A: 100 ml 0,2 m Zitratpufferlösung vom pH 5,0 mit 0,7 ml einer 0,01 m KCN-Lösung versetzt.

Lösung B: 1 g Ninhydrin in 100 ml Methylzellosolv gelöst. Anschließend kühlt man 5 Minuten in kaltem Wasser und verdünnt mit 5 ml eines Methanol-Wasser-Gemisches (3:2 v/v). Die Messung der Extinktion erfolgt bei 570 mμ gegen das Methanol-Wasser-Gemisch (Beckmanphotometer).

Zugleich mit den Analysen und ihren Blindwerten werden jedesmal die Extinktionen bekannter Ammonchloridmengen (die den in der Analyse zu erwartenden etwa entsprechen) ermittelt, um eine Eich-

kurve für die Auswertung zu erhalten. Da die Extinktionszunahme praktisch linear mit der Stickstoffmenge erfolgt, genügt es, die Extinktionen von zwei verschiedenen Ammonchloridmengen und ihre zugehörigen, durch die Reagenslösungen allein verursachten Leerwerte zu bestimmen. Auch hierbei ist es notwendig, jeweils mehrere Bestimmungen (etwa 4) auszuführen und die Werte dann zu mitteln.

Zur Aufstellung der Eichkurve und Auswertung der Analyse werden von den mit bekannten Stickstoff-Mengen erhaltenen Extinktionen (gemessen gegen Methanol-Wasser) die zugehörigen, durch die Reagenslösungen verursachten Leerwerte, von den Analysenwerten dagegen die im Diffusionsversuch ermittelten Blindwerte abgezogen.

3. Empfindlichkeit und Genauigkeit der Methode

Nachfolgende Beispiele sollen die Empfindlichkeit und Genauigkeit der Methode veranschaulichen. In einer größeren Zahl von Kölbchen wurden jeweils 1,7 γ bzw. 3,6 γ Ammoniak-Stickstoff in Form von Ammonchlorid vorgegeben und der Diffusion unterworfen. Die dabei erhaltenen Ergebnisse sind in Tabelle VI und Tabelle VII zusammengefaßt. In Spalte 1 finden sich die nach Abzug der Blindwerte erhaltenen Extinktionen, gemessen bei 570 mμ und einer Schichtdicke von 1 cm. Die nach der Diffusion in der Schwefelsäure wiedergefundene Stickstoffmenge und die prozentualen Abweichungen der Einzelmessungen sind in Spalte 2 bzw. Spalte 3 wiedergegeben.

Tabelle VI

Diffusionsversuch mit 1,70 γ Stickstoff (6,5 γ Ammoniumchlorid)

1 Extinktionen 570 mμ	2 Wiedergefundener Stickstoff in %	3 Abweichung %
0,306	97,4	2,6
0,311	99,0	1,0
0,311	99,0	1,0
0,319	101,5	1,5
0,318	101,2	1,2
0,331	105,4	5,4
0,336	106,9	6,9
0,306	97,4	2,6
0,321	102,2	2,2
0,316	100,6	0,6
Mittelwert	101,0 %	2,5 %

Tabelle VII

Diffusionsversuch mit 3,60 γ Stickstoff
(13,74 γ Ammoniumchlorid)

1	2	3
Extinktionen 570 mμ	Wiedergefundener Stickstoff in %	Abweichung %
0,676	99,6	0,4
0,671	98,9	1,1
0,704	103,7	3,7
0,648	95,6	4,4
0,686	101,0	1,0
0,676	99,6	0,4
0,656	96,7	3,3
0,686	101,0	1,0
Mittelwert	99,5 %	1,9 %

Wie die Ergebnisse zeigen, gestattet diese Methode die Bestimmung von 0,5 - 2 γ Ammoniak-Stickstoff mit einer Genauigkeit von ± 2-3 % bei einer Mittelung von etwa 6 Messungen. Größere Mengen von 2-5 γ Ammoniak-Stickstoff lassen sich mit einer Genauigkeit von 1 - 2 % bestimmen.

Diese Methode wurde für den speziellen Fall der Bestimmung von Ammonium-Ionen in Proteinhydrolysaten als Ergänzung zur papierchromatographischen Bestimmung der Aminosäuren ausgearbeitet. Doch ist sie selbstverständlich nicht allein auf diese Anwendung beschränkt, sondern auch für die Mikro-Ammoniakbestimmung in anderen biologischen Flüssigkeiten in gleicher Weise brauchbar.

Literaturverzeichnis

(1) K. Slotta — Ber. Dtsch. Chem. Ges. 71 1076 (1938)

(2) S.S.De — Sci. and Cult. 6 675 (1941)

(3) K. Slotta — Chemistry and Biochemistry of Snake Venoms Wien, Springer-Verlag 1955

(4) S. Paleus, I.B.Neilands — Acta chem. scand. 4 1024 (1950)

(5) S. Moore, W.H.Stein, W.Hirs — J. Biol. Chem. 200 493 (1953)

(6) H. Stein, H. Tallan — J. Biol. Chem. 200 507 (1953)

(7) F.G. Fischer,H.Dörfel — Biochem. Zeitschr. 324 544 (1953)

(8) Mc Farren — Anal. Chem. 23 168 (1951)

(9) T.W.Goodwin, R.A.Morton — Bioch. J. 628 40 (1946)

(10) F.G. Fischer,H.Dörfel — Bioch. Zeitschr. 324 465 (1953)

(11) I. Vellard — Le venin des araignées Paris (1936)

(12) R. Ramirez — Anales esc. nacl. cienc. biol. (mex) 4 379 (1947)
referiert: Chem. Abstr. (1948) 2681 i

(13) Temmin und Ichiro Kaku — J. Pharm. Soc. Japan 70 83 (1950)
referiert: Chem. Abstr. (1950) 4941 c

(14) I. Bolivar, G. Rodriguez — Ciencia (Mex.) 12 277 (1953)
ref.: Chem. Abstr. (1954) 4688 d

(15) W. Grassmann, K. Hannig Knedel — Dtsch.Med.Wschr. 11 333 (1950) Medizinische Monatsschrift Heft 10 Oktober 1951 Seite 707

(16) E. Wiedemann — Schweiz.med. Wschr. 76 241 (1946)

(17) C.S.Hanes, F.A. Isherwood — Nature 164 1107 (1949)

(18) O. Warburg — Biochem. Zeitschr. 287 291

(19) P. Karrer — Helv. Chim. Acta 20 55

(20) L. Barta — Bioch. Zeitschr. 277 412 (1935)

(21) J. Block — Paperchromatography 1952 S. 137

(22) E. Wiedemann — Plasma 1 277 (1953)

(23) M. Lederer — Australian J. Sci. 11 208 (1949)

(24) M.E. Fewster, D.A. Hall — Nature 168 78 (1951)

(25) L. Doub, J.M. Vandenbelt — J. Am. Soc. 69 2715 (1947)

(26) C. Cocking, E. Jemm — Bioch. J. 58 (1954) No I XII

(27) F.G. Fischer, H. Bohn — Hoppe-Seyler's Zeitschr.f.physiol. Chem. 302 285 (1955)

(28) I.R. Block — Paperchromatography New York 1952 S. 47

(29) I.R. Block — The Estimation of Amino Acids by quantitative Paper Chromatography New York 1953

(30) I.R. Block Paperchromatography New York 1952 S. 64
(31) E. Conway Bioch. J. 27 419, 413 (1933)
(32) L. Krieger Annal.biol.clin. (Paris) 9 519 (1951)
(33) I. Needham, E.J. Boell Bioch. J. 33 149 (1939)
(34) Tompkins J. Biol. Chem. 142 477 (1942)
(35) D. und H. Seligson J. Lab. Clin. Med. 38 324 (1951)
(36) H. Naylor ref. Chem. Abstr. (1951) 8401a
(37) E.A. Zeller Helv. Chim. Acta 23 1509 (1940)
(38) R.C.Warner, R.K.Cannan J. Biol. Chem. 142 725 (1942)
(39) K. Bailey Bioch. J. 1406 (1937) 31
(40) M.W. Rees Bioch. J. 40 632 (1946)
(41) J.W. Lewis J. Biol. Chem. 186 23 (1950)
(42) J.P. Martin, R. Synge Bioch. J. 35 294 (1941)
(43) H. Gordon, R. Synge, P. Martin Bioch. J. 35 1371 (1941)
(44) T. Macara, R. Plimmer Bioch. J. 34 1441 (1940)
(45) G. Secchi ref. Chem. Abstr. (1949) 7531 e
(46) S. Moore, W. Stein J. Biol.Chem. 176 367 (1948)
(47) C.E. Dent, F.C. Steward Nature 160 682 (1947)
Science 110 439 (1949)
(48) L.J. Reed J. Biol. Chem. 183 451 (1950)
(49) A.J.Woiwod, H,Proom J. Gen. Microbiol. 4 501 (1950)
(50) A.C. Hulme, W. Arthington Nature 165 716 (1950)
(51) G. Barger, H.H. Dale J. Chem. Soc. (1910) 2592
(52) N. Emmelin, W. Feldberg New Phytologist 48 143 (1949)
(53) D. Ackermann, H. Mauer . Pflügers Arch. 247 623 (1944)
(54) M. Weiss Bioch. Zeitschr. 97 170

L e b e n s l a u f

Ich wurde am 18. Oktober des Jahres 1928 in München geboren. Meine Jugend verbrachte ich in meiner Geburtsstadt, wo ich 4 Jahre die Volksschule und anschließend die Oberrealschule besuchte. Infolge Stellungswechsels meines Vaters kam ich im Dezember 1943 nach Oberschlesien, und wurde dort im Januar 1945 zur Wehrmacht einberufen. Nach der Entlassung aus der Gefangenschaft beendigte ich meine Schulzeit in Hof/Saale und legte im Sommer 1948 die Reifeprüfung ab.

Im Wintersemester 1948/49 begann ich in Würzburg mit dem Studium der Chemie und bin hier seit Abschluß meiner Diplomarbeit als wissenschaftlicher Assistent tätig.

Abgelegte Prüfungen: Vordiplom 12. Juli 1951
Diplom 31. Juli 1954

Ich habe mich noch nicht bei einer anderen Fakultät um den Doktorgrad beworben.

Ich versichere hiermit an Eides Statt, daß die gemachten Angaben der Wahrheit entsprechen, und daß ich keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.